

CHARAKTERISIERUNG VON INDUZIERBAREN GENEN IN MENSCHLICHEN BLUTZELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE
VORGELEGT DER

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II

DER

UNIVERSITÄT ZÜRICH

VON

JÜRGEN SCHMID

VON KILCHBERG

BEGUTACHTET VON

HERRN PROF. DR. C. WEISSMANN

ZÜRICH 1986

Druck: Fides Reprozentrale

CHARAKTERISIERUNG VON INDUZIERBAREN GENEN IN MENSCHLICHEN BLUTZELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE
VORGELEGT DER

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
DER
UNIVERSITÄT ZÜRICH

VON
JÜRG SCHMID
VON KILCHBERG

BEGUTACHTET VON
HERRN PROF. DR. C. WEISSMÄNN

ZÜRICH 1986

Druck: Fides Reprozentrale

Meinen Eltern

Herrn Prof. Dr. C. Weissmann, unter dessen Leitung diese Arbeit entstanden ist, möchte ich für die wissenschaftliche Förderung, die er mir zuteil'werden liess, meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes bedanke ich mich für ihre hilfreiche Zusammenarbeit.

Im weiteren bedanke ich mich bei Prof. Neurath für seinen Hinweis auf die Homologie zwischen der sog. atypischen Mastzell spezifischen Serinprotease (RMCP11) und der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA Klons 1-3E, bei Dr. Cantell für die Leukozyten RNA Präparate, bei Dr. Leban für die Synthese der Peptide, bei Dr. Luster für das Plasmid pIFN γ -31.7, bei Dr. Stubblebine für die Sequenzvergleiche und bei Frau Acklin für ihre Hilfe bei der Immunisierung der Kaninchen.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung

1. Einleitung
 - 1.1. Das blutbildende System bei Säugern
 - 1.2. Faktoren des hämopoetischen Systems und die Klonierung ihrer Gene
 - 1.3. Methoden zur Klonierung von cDNAs von Faktoren des hämopoetischen Systems
 - 1.4. Ueberblick über die eigenen Arbeiten
2. Das Interferon- α 6 Gen
 - 2.1. Resultate
 - 2.2. Diskussion
3. Charakterisierung von Staphylokokkus Enterotoxin A induzierten Genen in menschlichen peripheren Leukozyten
 - 3.1. Identifikation von vier cDNA Klonen
 - 3.2. Der cDNA Klon 1-3E
 - 3.2.1. Resultate
 - 3.2.2. Diskussion
 - 3.3. Der cDNA Klon 3-10C
 - 3.3.1. Resultate
 - 3.3.2. Diskussion
4. Material und Methoden
5. Literaturverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Sequenz des Interferon- α 6 Gens bestimmt. Der zweite Teil befasst sich mit der Isolation und Charakterisierung von cDNAs, deren entsprechende Gene in menschlichen peripheren Leukozyten durch Staphylokokkus Enterotoxin A induzierbar sind. Zwei cDNA Klone wurden sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des einen Klons (1-3E) zeigt eine Homologie zu Serinproteasen. Die grösste Homologie, 47 %, besteht zur sog. atypischen Mastzell spezifischen Serinprotease (RMCP11) der Ratte. Das primäre Translationsprodukt ist 247 Aminosäuren lang. Die 20 Aminosäuren am Amino-terminalen Ende des Proteins bilden vermutlich das Signal- und Aktivierungspeptid dieser Serinprotease, die wahrscheinlich von den produzierenden Zellen ausgeschieden wird. Staphylokokkus Enterotoxin A induzierte periphere Leukozyten enthalten mindestens zehnmal mehr 1-3E spezifische Transkriptionsprodukte als uninduzierte Leukozyten. Das entsprechende Gen kommt wahrscheinlich nur einmal pro haploidem Genom vor. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des zweiten Klons (3-10C) ist homolog zu β -Thromboglobulin (42 %), Platelet Factor 4 (35 %) und γ IP-10 (24 %), drei Faktoren, von denen mindestens die ersten beiden bei Entzündungen und Heilungsprozessen von Wunden wichtig sind. Das primäre Translationsprodukt ist 99 Aminosäuren lang, von denen die ersten 22 Aminosäuren vermutlich ein Signalpeptid bilden. Staphylokokkus Enterotoxin A induzierte periphere Leukozyten enthalten mindestens zehnmal mehr 3-10C spezifische Transkriptionsprodukte als uninduzierte Leukozyten. Das entsprechende Gen,

von dem sehr wahrscheinlich nur eine Kopie pro haploidem Genom vorhanden ist, kann auch in U937 Zellen, einer Monozyten-ähnlichen Zelllinie, durch Staphylokokkus Enterotoxin A induziert werden.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507223_0021

1. EINLEITUNG

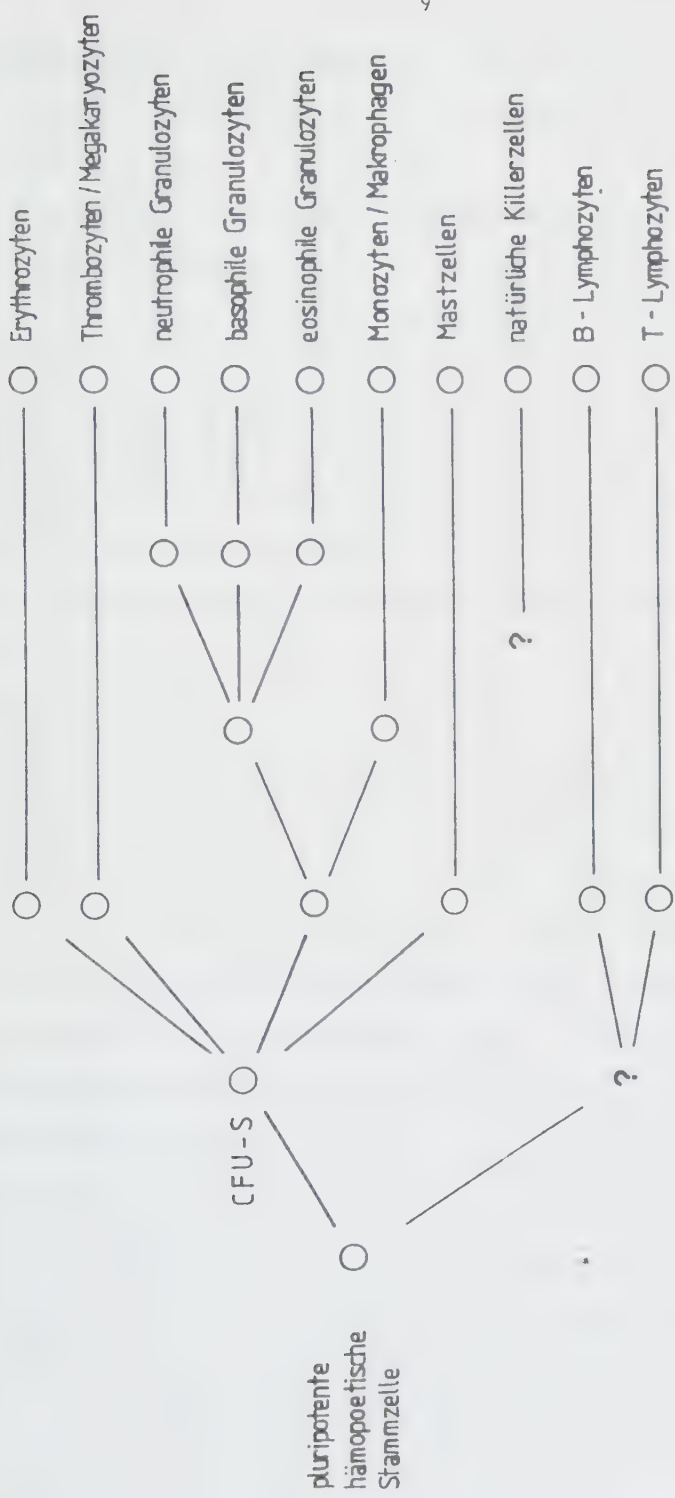
1.1. Das blutbildende System bei Säugern

Während der menschlichen embryonalen und foetalen Entwicklung können drei Blutbildungsperioden unterschieden werden. In einer ersten Periode, die bereits Ende der zweiten Entwicklungswoche des Embryos beginnt, entstehen im Mesenchym des Dottersackes Blutinseln. Der Dottersack von Säugern besteht aus zwei verschiedenen Schichten von Zellen, solchen vom inneren Endoderm und solchen vom äusseren Mesoderm. Die mesodermale Schicht kann weiter unterteilt werden in eine differenziertere Schicht von Zellen an der Oberfläche des Dottersackes und ein undifferenziertes Mesenchym. Zellen des Mesenchyms aggregieren zu sogenannten Blutinseln, wobei die äusseren Zellen solcher Aggregate Wände bilden und die Blutinseln abschliessen. Die Vergrösserung und Vernetzung der Blutgefässe entsteht durch Fusion einzelner Blutinseln. In der nächsten Phase der Hämpoese, d.h. etwa ab dem zweiten Lebensmonat beim Menschen, finden sich Herde von blutbildenden Zellen in der Leber und vom dritten Lebensmonat an in geringerem Masse auch in der Milz. Mit dieser Umstellung gelangt die Blutzellbildung von einem Gewebe ausserhalb des Embryos in den Embryo selbst. In dieser Phase werden erstmals neben erythroiden Zellen vereinzelt Vorläuferzellen von Granulozyten und Thrombozyten beobachtet.^a Die hämpoetische Funktion der Leber erreicht ihren Höhepunkt zwischen dem dritten und vierten Monat der foetalen Entwicklung. In diesem Stadium gelangen die ersten lymphoiden Zellen in den Thymus.

Ab dem fünften Monat beginnt die dritte Periode der Blutzellbildung, die Hämoopoese im Knochenmark, die während des ganzen Lebens aktiv bleibt. Die Herkunft der blutbildenden Zellen im Knochenmark war lange Zeit umstritten. Moore und Metcalf (1970) wiesen bei Hühnern eine Wanderung dieser blutbildenden Zellen, auch hämopoetische Stammzellen genannt, vom Dottersack zur Leber und von dort zum Knochenmark nach. In der Entwicklung des blutbildenden Systems entstehen nur einmal, und zwar im Dottersack, aus Mesenchymzellen des Mesoderms hämopoetische Stammzellen. Diese Zellen besiedeln in der späteren Entwicklung des Embryos Leber und Milz und wandern von diesen Organen über das periphere Blut in die primitiven Knochenmarkshöhlen ein.

Stammzellen besitzen zwei wichtige Eigenschaften, nämlich die, sich zu reproduzieren und sich zu differenzieren. Neben den Stammzellen des blutbildenden Systems, gibt es noch solche für Epidermiszellen, Keimbahnzellen und Epithelzellen des Verdauungstrakts.

Die Stammzellen des hämopoetischen Systems sind pluripotente Zellen, die zu den verschiedenen Blutzellen ausreifen können. Die reifen Blutzellen werden aufgrund morphologischer Unterschiede meistens in fünf Gruppen unterteilt, in die Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (siehe Fig. 1). Die Zellen der ersten vier Gruppen werden auch als myeloide Zellen bezeichnet. Die Granulozyten werden vielfach noch unterteilt in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten und die Lymphozyten in B- und



Figur 1. Schematische Darstellung der Differenzierung der pluripotenten, hämopoetischen Stammzelle. Hypothesetische und unbekannte Differenzierungsstadien sind mit ? bezeichnet. (Für weitere Erläuterungen siehe Text.)

T-Lymphozyten. Ebenfalls aus hämopoetischen Stammzellen differenzieren sich Mastzellen und natürliche Killerzellen.

Erste Hinweise auf die Existenz pluripotenter hämopoetischer Stammzellen erbrachten Versuche von Till und McCulloch (1961). In Mäuse, die mit Röntgenstrahlen bestrahlt wurden, die alle blutbildenden Zellen abtöteten, injizierten Till und McCulloch Knochenmarkzellen aus nichtbestrahlten Mäusen. Acht bis zehn Tage später waren in der Milz der bestrahlten Mäuse makroskopisch sichtbare Zellkolonien vorhanden. Diese Milzkolonien bestehen, wie histologische Untersuchungen zeigten, entweder aus Zellverbänden, die vorwiegend Zellen einer Entwicklungsbahn enthalten oder aus gemischten Kolonien aller Zellreihen (Curry & Trentin, 1967; Silini et al., 1968). Der Nachweis von gemischten Kolonien war ein Hinweis auf die Existenz pluripotenter Stammzellen (Becker et al., 1963; Wu et al., 1967). Diese milzkolonienbildende Zelle wird auch "colony-forming-unit-spleen" abgekürzt CFU-S genannt. Um zu beweisen, dass alle Zellen einer Kolonie von einer einzigen Zelle abstammen, wurden in einem ähnlichen Experiment die Knochenmarkzellen der Spendermaus mit einer solchen Dosis bestrahlt, dass Chromosomenabnormalitäten induziert wurden. Da die Wahrscheinlichkeit, dass in zwei Stammzellen identische Chromosomenaberrationen erzeugt werden, sehr klein ist, dient jedes dieser abnormen Chromosomen als Marker für eine einzige Stammzelle. Alle Zellen einer Milzkolonie, ob aus einem Zelltyp bestehend oder aus mehreren, hatten immer dasselbe aberrante Chromosom (Wu et al., 1967).

Damit war der Beweis erbracht, dass im Knochenmark Zellen existieren, die die Fähigkeit haben, sich in myeloide Zellen zu differenzieren. Nicht so einfach war es zu zeigen, dass auch die lymphoiden Zellen von derselben pluripotenten Zelle abstammen, da diese Zellen nicht in Kolonien, sondern verstreut in der Milz vorkommen. Da sie aber oft dieselben Chromosomenmarker wie die Zellen in den Milzkolonien trugen, wurde daraus geschlossen, dass sich lymphoide Zellen aus derselben Stammzelle differenzieren können (Wu et al., 1968; Abramson et al., 1977). Arbeiten von verschiedenen Gruppen bestätigten diese Resultate (Prchal et al., 1978; Mintz et al., 1984; Dick et al., 1985; Keller et al., 1985).

Wie oben erwähnt, müssen Stammzellen sowohl die Fähigkeit haben, sich zu reproduzieren, d.h. Stammzellen zu bleiben, als auch sich zu differenzieren. Um den Mechanismus zu erklären, der das Verhalten der Stammzellen reguliert und bestimmt, ob die Tochterzellen einer Stammzelle wieder Stammzellen sind oder sich differenzieren sollen, wurden mehrere Modelle postuliert. So spielen nach einem Modell lokale, über kurze Distanzen wirkende Mechanismen eine wichtige Rolle, die entweder durch direkten Zell-Zellkontakt oder durch humorale Faktoren wirken (Rencricca et al., 1970; McCulloch et al., 1973). Nach einem zweiten Modell sind vor allem Faktoren, die auch über längere Distanzen wirken, wichtig (Stohlman jr. et al., 1973). Nach Curry und Trentin (1967¹) wiederum haben die Stromazellen der hämopoetischen Organe eine wichtige Funktion bei der Regulation der Hämoopoese. Diese Zellen schaffen bestimmte mikroökologische Bedingungen, die die Ansiedlung,

die Proliferation und die Differenzierung von Stammzellen gewährleisten. Als weiteren möglichen Regulationsmechanismus, der die Entscheidung zur Replikation oder Differenzierung der Stammzelle beeinflusst, schlugen Till et al. (1964) ein stochastisches Modell vor. Durch einen Zufallsprozess würde bestimmt, ob sich eine Stammzelle differenziert oder nicht.

1.2. Faktoren des hämopoetischen Systems und die Klonierung ihrer Gene

In diesem Abschnitt soll kurz die Klonierung der cDNAs und Gene für Faktoren, die die Differenzierung und Proliferation der pluripotenten Stammzelle und ihrer Nachfolgezellen beeinflussen, beschrieben werden. Erste Hinweise auf das Vorhandensein solcher Faktoren ergaben Versuche, in welchen Knochenmarkzellen in vitro in halbsoliden Medien in Gegenwart von bestimmten Seren oder Zellüberständen gezüchtet wurden (Pluznik & Sachs, 1965; Bradley & Metcalf, 1967). Die biochemische Charakterisierung dieser Faktoren war lange Zeit eine beinahe unlösbare Aufgabe, konnte doch nur selten genügend Material aufgearbeitet werden. Je nach biologischer Aktivität, die untersucht wurde, erhielt ein und derselbe Faktor ganz verschiedene Namen. Interleukin-3 z.B. wird in der Literatur auch multi-colony stimulating factor, multilineage hemopoietic growth factor, hematopoietic cell growth factor (Bazill et al., 1983), burst promoting activity (Iscoe et al., 1982), P-cell stimulating factor (Schrader et al., 1981), mast cell growth factor (Nabel et al., 1981), histamine-producing cell stimulating factor (Dy et al., 1981) oder Thy1-inducing activity (Schrader et al., 1982) genannt. Dass bei der Maus alle diese Aktivitäten, die Interleukin-3 zugeschrieben wurden, von einem einzigen Protein ausgelöst werden, zeigten Ihle et al. (1983) mit gereinigtem Interleukin-3 und Greenberger et al. (1985) mit rekombinantem Interleukin-3 aus Affenzellen, in denen die Maus Interleukin-3 cDNA exprimiert wurde. Erst gentechnologische Methoden ermöglichen die Produk-

tion solcher Substanzen in grossem Massstab, wodurch auch ihre Identifikation viel einfacher wird. So wäre die Identifikation der verschiedenen α -Interferone auf der Proteinebene mit Bestimmtheit viel aufwendiger gewesen, als es die Charakterisierung der verschiedenen Gene war.

Etablierte Zelllinien synthetisieren viele dieser Faktoren konstitutiv oder nach Induktion mit einem Mitogen oder Viren. Andere Faktoren können aus induzierten peripheren Leukozyten gewonnen werden. Als Mitogene wirken so verschiedene Substanzen wie Staphylokokkus Enterotoxin A, Phytohämagglutinin A, Concanavalin A, Lipopolysaccharide oder 4-Phorbol-12-Myristat 13-Acetat.

Die Interleukin-3 entsprechende cDNA der Maus klonierten Fung et al. (1984) und das entsprechende Gen Miyatake et al. (1985b). Beim Menschen gibt es ein Lymphokin mit Interleukin-3 ähnlichen Aktivitäten (Welte et al., 1985), doch wurde das entsprechende Gen noch nicht isoliert. Interleukin-3 ist essentiell für die Reifung von Erythrozyten, Megakaryozyten, Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen (Iscove, 1978). Zusätzlich brauchen Erythrozyten und Megakaryozyten noch weitere Faktoren für ihre Differenzierung. So ist die Reifung der Erythrozyten abhängig von Erythropoetin (Krantz et al., 1963). Die menschlichem Erythropoetin entsprechende cDNA sowie das entsprechende Gen wurden kloniert (Jacobs et al., 1985). Erythroid-potentiating activity (EPA) ist ein weiterer Faktor, der die Entwicklung der Erythrozyten stimuliert. EPA wurde nur beim Menschen isoliert, wirkt jedoch auch auf Mauszellen

(Gasson et al., 1985). Sowohl cDNA wie Gen wurden für EPA kloniert (Gasson et al., 1985). Zusätzlich zu Interleukin-3 beeinflussen drei Faktoren die Entwicklung der Granulozyten und Makrophagen, die sogenannten Colony Stimulating Factors, abgekürzt CSFs (Metcalf, 1984). Die für den Granulozyten-Makrophagen-CSF kodierende menschliche cDNA (Lee et al., 1985) und diejenige der Maus (Gough et al., 1984) sowie die entsprechenden Gene (Miyatake et al., 1985a; Stanley et al., 1985) sind kloniert. Die menschliche cDNA für Makrophagen-CSF wurde von Kawasaki et al. (1985) und die für Granulozyten-CSF von Nagata et al. (1986) kloniert.

Die Entwicklung der B- und T-Zellen ist viel weniger gut dokumentiert als diejenige der myeloiden Zellen. Interleukin-1 ist ein Faktor, der notwendig ist für die Proliferation und Differentiation von lymphoiden Zellen (Kampschmidt, 1984). Eine für Interleukin-1 kodierende cDNA der Maus klonierten Lomedico et al. (1984) und eine vom Menschen Auron et al. (1984). March et al. (1985) zeigten, dass der Mensch mindestens zwei Gene hat, deren Translationsprodukte Interleukin-1 Aktivität haben. Diese Gruppe isolierte zwei cDNA Klone, die, in E. coli zur Expression gebracht, Interleukin-1 Aktivität hatten. Beide Proteine, die eine Homologie von 26 % haben, induzieren die Synthese von Interleukin-2 in T-Zellen. Biologische Aktivitäten von Interleukin-2 sind unter anderem die erhöhte Proliferation von Vorläufern der T-Zellen (Chen & Sabato, 1967), ein stimuliertes Wachstum von T-Zellkolonien in vitro (Morgan et al., 1976) und die Aktivierung von Killerzellen (Dennert, 1980). Die erste menschliche Interleukin-2 entsprechende cDNA

klonierten Taniguchi et al. (1983) und das menschliche Gen Degraive et al. (1983).

Neben den eigentlichen hämopoetischen Wachstumsfaktoren beeinflussen verschiedene andere Substanzen die Zellen des blutbildenden Systems, wie die Interferone, die aufgrund ihrer antiviralen Aktivitäten entdeckt wurden (Lindenmann et al., 1957). Im weiteren haben die Interferone eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum (Pauker et al., 1962), und mit Interferon behandelte Zellen haben eine erhöhte Sensitivität gegen doppelsträngige RNA (Stewart II et al., 1972). Interferon bewirkt auch eine gesteigerte Expression von Oberflächenantigenen in Zellen (Lindahl et al., 1973) und aktiviert Makrophagen (Huang et al., 1971). Die Interferone werden unterteilt in Interferon- α , Interferon- β und Interferon- γ . (Für eine Zusammenfassung des Interferonsystems siehe Stewart II, 1979 und Weissmann & Weber, 1986.). Die erste menschliche Interferon- α entsprechende cDNA klonierten Nagata et al. (1980a). Wie weitere Arbeiten von mehreren Gruppen zeigten, gibt es beim Menschen mindestens 15 verschiedene Interferon- α Gene mit intakten Leserastern und noch mindestens fünf Pseudogene. Diese Daten sind in der Arbeit von Henco et al. (1985) zusammengefasst. Im Gegensatz zu den Interferon- α Genen gibt es beim Menschen vom Interferon- β und Interferon- γ Gen nur je eine Kopie pro haploidem Genom. Von beiden Proteinen wurden die entsprechenden cDNAs (Taniguchi et al., 1979; Gray et al., 1982) und die Gene (Lawn et al., 1981; Gray & Goeddel, 1982) kloniert.

1.3. Methoden zur Klonierung von cDNAs von Faktoren des hämopoetischen Systems

Der Aufgabe, aus allen verschiedenen mRNAs einer Zelle diejenige zu identifizieren, die für einen bestimmten Faktor kodiert, entspricht die Klonierung einer gewünschten cDNA. Dazu muss zuerst eine cDNA Bank, die die mRNA Population repräsentiert, angelegt werden, aus der anschliessend die gesuchten Klone identifiziert werden können. In einem ersten Schritt wird poly(A)⁺-RNA mit Retrotranskriptase und Oligo(dT) als Primer in eine einzelsträngige DNA umgeschrieben. Anschliessend wird der RNA-Strang abverdaut und mit Retrotranskriptase oder DNA-Polymerase der zweite, komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Die so synthetisierte DNA ist eine exakte Kopie der Poly(A)⁺-RNA, daher der Name copy-DNA oder abgekürzt cDNA. Als nächstes muss die cDNA in ein bakterielles Plasmid eingesetzt werden, das ein Resistenzgen trägt. Mit diesem Gemisch von cDNAs, integriert in Plasmide, werden Bakterien transfektiert. Dank dem Resistenzgen auf dem Plasmid kann nun für Bakterien selektioniert werden, die ein Plasmid aufgenommen haben. Mit diesem Schritt wird einerseits das Gemisch der cDNAs in einzelne Klone aufgetrennt und andererseits jede einzelne cDNA vermehrt. Die Aufgabe besteht nun darin, unter allen entstandenen Klonen diejenigen zu identifizieren, an denen ein Interesse besteht.

A. Hybridisierungs-Translationsassay

Der Hybridisierungs-Translationsassay wurde von Harpold et al. (1978) entwickelt. Linearisierte und denaturierte Plasmid-DNA

wird an Nitrozellulosefilter (oder andere Membranen) gebunden. An die fixierte DNA kann Poly(A)⁺-RNA hybridisieren, falls auf der cDNA zur RNA komplementäre Sequenzen vorliegen. Alle nicht an die DNA hybridisierte RNA wird in einem Waschschrift entfernt. Die gebundene RNA wird danach abgelöst und in einem Translationssystem in Proteine übersetzt, welche auf ihre biologische Aktivität oder antigene Eigenschaften getestet werden können. Wird die Aktivität gefunden, heisst das, dass auf dem Filter eine cDNA fixiert ist, an die RNA hybridisieren kann, die für das gesuchte Protein kodiert. Um den endgültigen Beweis zu erbringen, dass es sich bei der isolierten cDNA um die richtige handelt, muss diese noch in eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen zur Expression gebracht werden.

Nagata et al. (1980a) verwendeten diese Methode, als sie die erste Interferon- α entsprechende cDNA klonierten. Mittels Hybridisierungs-Translationsassays wurden auch die cDNAs von Interferon- β (Taniguchi et al., 1979), Interleukin-2 (Taniguchi et al., 1983) und Interleukin-1 (March et al., 1985) isoliert.

B. Plus-Minus-Hybridisierung

Mittels Plus-Minus-Hybridisierung können cDNAs identifiziert werden, die spezifisch sind für mRNAs, die in einer mRNA Population vertreten sind, nicht aber in einer zweiten. Synthetisiert beispielsweise eine Zelllinie erst nach Induktion mit einem Mitogen einen bestimmten Faktor, so wird von der Poly(A)⁺-RNA aus den induzierten Zellen eine cDNA Bank hergestellt. Die Kolonien werden auf Filtern wie für eine

Kolonienhybridisierung (Grunstein & Hogness, 1975) aufgearbeitet, wobei jedoch von jedem Filter ein Duplikat gemacht wird. Als Hybridisierungsproben dienten radioaktiv markierte einzelsträngige cDNAs, die aus Poly(A)⁺-RNA von induzierten bzw. uninduzierten Zellen synthetisiert wird (St. John & Davis, 1979; Hoeijmakers et al., 1980). Klone, an die nur die Probe der induzierten Zellen hybridisiert, sind Kandidaten für cDNAs, die dem Faktor entsprechen (siehe Fig. 4). Um zu beweisen, dass eine solche cDNA dem gesuchten Faktor entspricht, müssen noch weitere Versuche gemacht werden. Erst die direkte Expression der cDNA (siehe nächsten Abschnitt) kann zeigen, ob die cDNA für die gesuchte Aktivität kodiert.

Mit Hilfe einer Plus-Minus-Hybridisierung wurden die cDNAs vom Interferon- γ (Gray et al., 1982) und Interferon- β (Taniguchi et al., 1979) kloniert.

C. Direkte Expression

Eine weitere Methode, wie cDNA Klone identifiziert werden können, besteht darin, dass die cDNA direkt in Zellen exprimiert wird. Die Zelle dient als Transkriptions-Translationssystem, worauf die Translationsprodukte auf die gesuchte Aktivität hin untersucht werden können. Die cDNA kann aber auch in vitro in RNA überschrieben werden und anschliessend in vivo, z.B. in Oocyten translatiert werden.

Mit diesen Methoden gelang die Klonierung der cDNAs von Interleukin-2 der Maus (Yokota et al, 1985) und vom IgG1 Induktionsfaktor der Maus (Noma et al., 1986).

D. Identifikation der cDNA bei bekannter Proteinsequenz

Der grosse Fortschritt bei der Reinigung von Proteinen (allem voran dank der Hochdruckflüssigkeitschromatographie) und der Gebrauch von immer kleineren Mengen für die Sequenzbestimmung ermöglichen heute die Strukturbestimmung von Proteinen, wie es noch vor einigen Jahren nicht möglich gewesen wäre. Von der Proteinsequenz lässt sich die Sequenz der cDNA ableiten, dies jedoch nicht mit letzter Gewissheit, da der genetische Code degeneriert ist. Darum muss ein Gemisch von Oligonukleotiden, die der Proteinsequenz entsprechen könnten, als Probe für eine Kolonienhybridisierung verwendet werden. cDNA-Klone, die mit der Probe hybridisieren, müssen noch sequenziert werden, um sicher zu sein, dass sie dem Protein entsprechen.

Mit dieser Methode wurden beispielsweise die entsprechenden cDNAs vom Granulozyten-Makrophagen-CSF (Gough et al., 1984), vom Granulozyten-CSF (Nagata et al., 1986), vom Makrophagen-CSF (Kawasaki et al., 1985), von Erythropoetin (Jacobs et al., 1985) und von erythroid-potentiating activity (Gasson et al., 1985) kloniert.

1.4. Ueberblick über die eigenen Arbeiten

A. Das Interferon- α 6 Gen

Die Bestimmung der Primärstruktur der verschiedenen Interferon- α Gene ergab wichtige Aufschlüsse über diese Familie von Genen. Anhand von Sequenzvergleichen konnten die strukturellen Beziehungen der Gene bestimmt werden (Henco et al., 1985). Erst die Kenntnis der Primärstruktur erlaubte auch das Studium von funktionellen Aspekten der Interferon- α Gene, wie die Suche nach Regulationssequenzen (Ragg & Weissmann, 1983; Ryals et al., 1985), die Zellspezifität einzelner Interferone (Streuli et al., 1981; Valenzuela et al., 1985) oder die Analyse der zellspezifischen Expression einzelner Interferon- α Gene (Hiscott et al., 1984a,b).

B. Charakterisierung von Staphylokokkus Enterotoxin A induzierten Genen in peripheren Leukozyten des Menschen

Alle bis heute beschriebenen Faktoren, die wichtig sind für das blutbildende System von Säugetieren, wurden dank einer biologischen Aktivität identifiziert. Vorausgehend stand immer eine Beobachtung, wie z.B. die Differenzierung einer CFU-S in Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und Erythrozyten, und erst nachher wurde versucht Faktoren zu isolieren, die für diese Vorgänge verantwortlich waren. Die Identifikation von Faktoren beschränkt sich somit auf solche, bei denen eine Beobachtung an Zellen in vivo oder in vitro auf ihre Existenz hinwies. Es ist aber gut vorstellbar, dass weitere Faktoren für das blutbildende System wichtig sind, die jedoch noch

nicht bekannt sind, da die Beobachtung ihrer Aktivitäten fehlt. Wie solche Faktoren, ohne Kenntnisse einer biologischen Aktivität, isoliert und charakterisiert werden können, wird im zweiten Teil der Arbeit beschrieben. Als Ausgangsmaterial für diese Untersuchungen dienten Staphylokokkus Enterotoxin A induzierte periphere Leukozyten des Menschen, von denen bekannt war, dass sie nach der Induktion Interferon- γ produzierten (Cantell et al., in press). Von Mitogenen wie Staphylokokkus Enterotoxin A war bekannt, dass sie zur Induktion einer ganzen Reihe von Faktoren führten. Solche Faktoren wurden, ohne Kenntnisse einer biologischen Aktivität, mittels Plus-Minus-Hybridisierung (siehe Fig. 4) kloniert, wobei ein spezielles Interesse an Faktoren bestand, die von den Zellen ausgeschieden werden.

2. DAS INTERFERON- α 6 GEN

2.1. Resultate

Aus einer menschlichen Genbank (Lawn et al., 1978) isolierten Nagata et al. (1980b) mehrere Interferon- α Gene. Das im chromosomalen Klon chr-12 enthaltene Gen wurde auf einem 4000 Basenpaar langen EcoRI-Restriktionsfragment lokalisiert. Dieses Fragment wurde von K. Henco mittels "G/C-tailing" in die PstI-Stelle des Plasmids pBR322 eingesetzt. Die Konstruktion, in der das Interferongen dieselbe Orientierung wie das Ampicillin-Resistenzgen hatte, wurde pEco 12,2, die Konstruktion mit der umgekehrten Orientierung pEco 12,3 genannt. In Extrakten von Plasmid pEco 12,2 enthaltenden E.coli Bakterien konnte Interferon-Aktivität nachgewiesen werden (K. Henco, pers. Mitteilung). Später wurde dieses Gen Interferon- α 6 genannt.

Einseitig überlappende Deletionen des klonierten Fragmentes im Plasmid pEco 12,2 wurden nach der Methode von Frischaut et al. (1980) hergestellt. Alle Deletionen hatten am 5'-Ende, durch das Einsetzen eines EcoRI-Linkers, eine einzelne EcoRI-Schnittstelle, von der aus sowohl die 5'- wie 3'-markierte DNA nach der Methode von Maxam und Gilbert (1977) sequenziert wurde. Die Sequenz vom Interferon- α 6 und die Sequenzstrategie sind in Fig. 2 wiedergegeben. Die Sequenz ist ebenfalls in Henco et al. (1985) veröffentlicht.

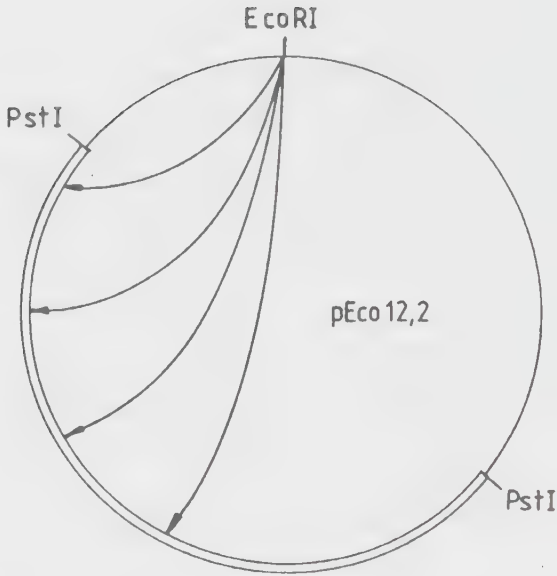


Fig. 2a

Figur 2. Sequenzbestimmung des Interferon- α 6 Gens

a. Strategie. Das in einem 4000 Basenpaar langen EcoRI-Restriktionsfragment enthaltene Interferongen wurde mittels "G/C-tailing" in die PstI-Stelle des Plasmids pBR322 eingesetzt. Ausgehend von der EcoRI-Stelle wurden nach der Methode von Frischauf et al. (1980) verschieden lange DNA-Fragmente vom Plasmid pEco 12,2 deletiert. Von den Endpunkten der Deletionen und von Restriktionsstellen aus wurden die 5'- oder 3'-markierte DNA nach der Methode von Maxam und Gilbert (1977) sequenziert.

b. Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Interferon- α 6 Gens. Mit * sind die Endpunkte der Deletionen bezeichnet, von denen aus sequenziert wurde.

Fig.2b

* 10 30 50
 TGCTCAGAGTTAAGTTAAATGTCAAATTTTAAAAATTTAACTTTTAGTTAAATTACTTT

70 90 110
 GCCATTCTTAACAGATCAAGAAATAATAAAAGTAACTTTATGCTTTTCTTTTAGTGTG

130 150 170
 CAAGTAGACATACATACAGTACATAAGGAGATATACAATATATTTGTTATTAAAAATTTAA

190 210 230
 TAAAAATTTAATTTCAATTAAGAAAAAATTTCTTAAAGACTCTGGAGGCAGGCAAGAG

250 270 290
 AAGGGAGTGTCAATAATGACCACATACACACACAAACACACACAAAACCTGGTTGAAAA

310 330 350
 ACTACTCTATACCCATGTAGAGAGTAAATAAATGAAAGCAAAATCAGACGTAGAAAGTAA

370 390 410
 ATTCTGAAAATGGAAACTAGTATGTTCCCTATTTAAGACCTACACATAAAGCAAGGTCTT

430 450 470
 CAGAGAACCTAGAGCTGAAGGTTGAGAGTCACCCATCTCAACAAGTCCAACAGCATCTGC

490 510 530
 AACATCTACAATGGCTTTGCCTTTTGCTTTACTGATGGCCCTGGTGGTGCTCAGCTGCAA
 MetAlaLeuProPheAlaLeuLeuMetAlaLeuValValLeuSerCysLy
 1 10

550 570 590
 * GTCAAGCTGCTCTCTGGAAGTGTGATCTGCCTCAGACCCACAGCCTGGGTACAGGAGGAC
 sSerSerCysSerLeuAspCysAspLeuProGlnThrHisSerLeuGlyHisArgArgTh
 20 30

Fig.2b (Forts.)

610	630	650	*
CATGATGCTCCTGGCACAAATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGTCTGAAGGACAGACA			
rMetMetLeuLeuAlaGlnMetArgArgIleSerLeuPheSerCysLeuLysAspArgHi			
40	50		
670	690	710	
TGACTTCAGATTCCCCAGGAGGAGTTTGATGGCAACCAGTTCAGAAAGGCTGAAGCCAT			
sAspPheArgPheProGlnGluGluPheAspGlyAsnGlnPheGlnLysAlaGluAlaIl			
60	70		
730	750	770	*
CTCTGTCCTCCATGAGGTGATTTCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATC			
eSerValLeuHisGluValIleGlnGlnThrPheAsnLeuPheSerThrLysAspSerSe			
80	90		
790	810	830	*
TGTTGCTTGGGATGAGAGGCTTCTAGACAACTCTATACTGAACCTTACCAGCAGCTGAA			
rValAlaTrpAspGluArgLeuLeuAspLysLeuTyrThrGluLeuTyrGlnGlnLeuAs			
100	110		
850	870	890	
TGACCTGGAAGCCTGTGTGATGCAGGAGGTGTGGGTGGGAGGGACTCCCCCTGATGAATGA			
nAspLeuGluAlaCysValMetGlnGluValTrpValGlyGlyThrProLeuMetAsnGl			
120	130		
910	930	950	*
GGACTCCATCCTGGCTGTGAGAAAATACTTCCAAAGAATCACTCTCTACCTGACAGAGAA			
uAspSerIleLeuAlaValArgLysTyrPheGlnArgIleThrLeuTyrLeuThrGluLy			
140	150		
970	990	1010	
AAAGTACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAATCATGAGATCCTTCTCTTC			
sLysTyrSerProCysAlaTrpGluValValArgAlaGluIleMetArgSerPheSerSe			
160	170		
1030	1050	1070	
ATCAAGAACTTGCAAGAAAGGTTAAGGAGGAAGGAATAAGACCTGATCCAACACAGAAA			
rSerArgAsnLeuGlnGluArgLeuArgArgLysGlu			
180	189		
1090	1110	1130	
CGACTCCCATTGACGACTACACCAGCTTGCACTTTCATGATCTGCCATTTTAAAGACTCT			

Fig.2b (Forts.)

1150 1170 1190
 TGTTCCTGCTATAACCATACCATGAGTTGAATCAAACGCGTCAAGTATTTTCAAGTGTGT

1210 1230 1250
 TAAGCAACATCGTGTTTCAGTTGCACAGGAACTAGTCCCTTACAGATGACTAAGCTGATGG

1270 1290 1310
 ATCTATTTATCTATTTATTAAATGTATATTTATTTGACAATAATATTTAATTTTTTGCCC

1330 1350 1370
 ATATAAGTGCATAAAATGTATACCTTTATATTGTTGATAACATAACAAAATATATTTTCT

1390 1410 1430
 ATGTTTAGTCGATGTATTATTTGTTTAGTTTATTAAATATTTACTATAGAAAACCTCTT

1450 1470 1490
 GGATTTGTTTATTCTCTAAGGAGAAACACCAAGCCGATTCTCCAACATGATTTAAAAATG

1510 1530
 TATGGTTCAATTCATTGATTCATTGTTATTATACTCAAGTTAT

2.2. Diskussion

Weder in menschlichen peripheren Leukozyten noch in Namalwa-zellen, die mit einem Virus induziert wurden, konnten durch S_1 -Analysen (Weaver & Weissmann, 1979) Interferon- $\alpha 6$ spezifische Transkriptionsprodukte nachgewiesen werden (Hiscott et al., 1984a). Eine mögliche Erklärung, wieso das Interferon- $\alpha 6$ Gen nach einer viralen Induktion nicht exprimiert wird, gibt der Sequenzvergleich mit den anderen Interferon Genen. Beim Interferon- $\alpha 1$ Gen wurden die Sequenzen, die für eine Expression des Gens nach einer Induktion mit Viren notwendig sind, genauer bestimmt (Ragg & Weissmann, 1983; Ryals et al., 1985). Wie in der Arbeit von Ryals et al. (1985) gezeigt wurde, ist eine Sequenz zwischen Nukleotid -109 und -64 (mit +1 ist die CAP-Stelle bezeichnet) verantwortlich für die Induzierbarkeit des Interferon- $\alpha 1$ Gens und liegt weiter 5' als die TATA-Box (-33 bis -27). In dieser Region wird eine Sequenz wiederholt, wobei jede Sequenz aus zwei Elementen R1 und R2 bzw. R1' und R2' besteht. R2 und R2' sind identische Sequenzen von 5 Nukleotiden (CAGAA). Ausser einem Nukleotid haben die Elemente R1 und R1' über 8 Basenpaare dieselbe Sequenz (A(A/T)GGAAAG). Diese Elemente findet man in verschiedenen Interferongenen, die durch Viren induziert werden können (siehe Fig. 3; Ryals et al., 1985). Die Sequenz vom Interferon- $\alpha 6$ Gen unterscheidet sich an zwei Stellen in dieser Region von den anderen Interferon- α Genen des Typs I (siehe Fig. 3). Bei der Position -87 hat das Interferon- $\alpha 6$ Gen ein Thymin anstelle eines Adenins. Der zweite Unterschied ist eine Deletion zwischen -70 und -61 und umfasst die gesamte Sequenz

	-110	-100	R1	-90	R2	-80	R1'	-70	R2'	-60	-50	-40	-30	-20
IFN- 1														
IFN- 2														
IFN- 4b														
IFN- 5														
IFN- 7														
IFN- 13														
IFN- 14														
IFN- 16														
IFN- 17														
IFN- 6														

Figur 3. Vergleich der Promotorsequenzen der Interferon-~~1~~ Gene (IFN-~~1~~) des Typs I. Mit R1, R2, R1' und R2' sind die wiederholten Sequenzen markiert, die nach Ryals et al. (1985) für die Induktion mit Viren essentiell sind. Bei Position -30 ist zusätzlich die TATA-Box hervorgehoben. Die zwei Unterschiede der IFN-~~6~~ Sequenz zu den anderen Genen, die alle exprimiert werden, sind unterstrichen. Die Sequenzen wurden aus der Arbeit von Henco et al. (1985) übernommen. Die Numerierung ist bezogen auf die CAP-Stelle von IFN-~~1~~.

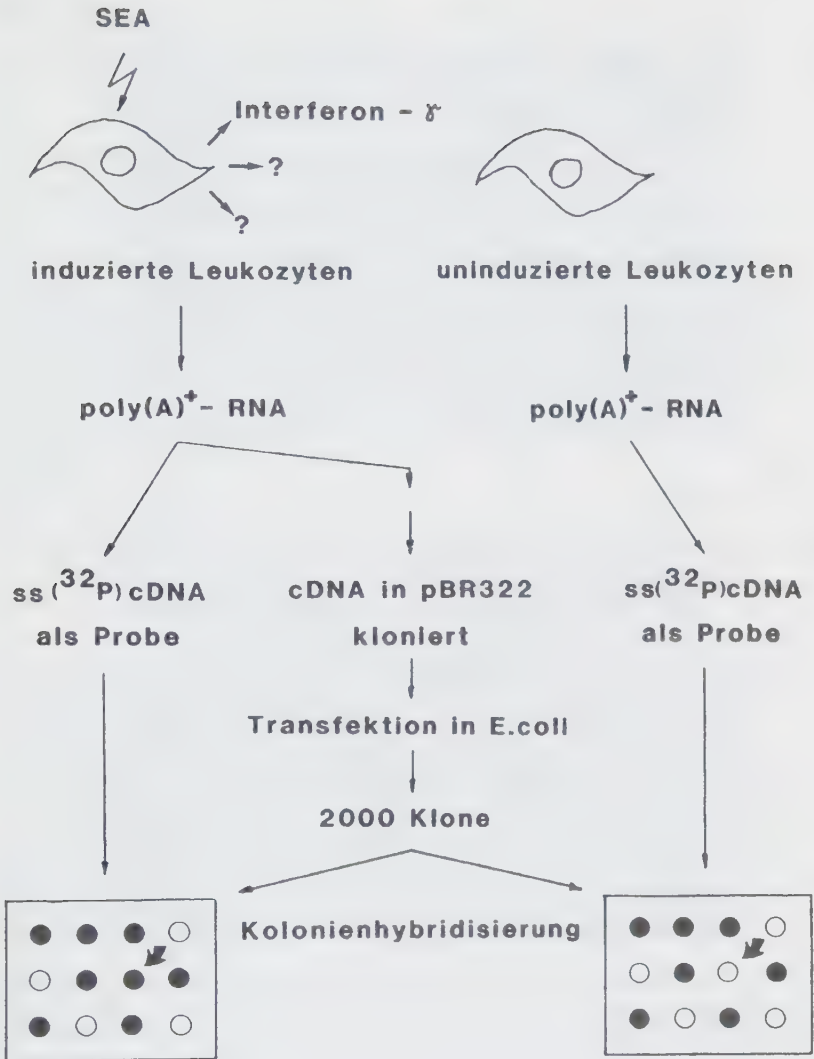
von R2'. Ob einer dieser zwei Unterschiede alleine oder beide zusammen dazu führen, dass das Interferon- α 6 Gen nicht mit Viren induziert werden kann, ist nicht bekannt. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass andere Gründe dafür verantwortlich sind. Die DNA könnte beispielsweise methyliert sein und so zur Inaktivierung des Gens führen (Razin & Riggs, 1980), was zur Frage Anlass gäbe, wieso die DNA des Interferon- α 6 Gens methyliert würde, nicht aber die anderen Interferon- α Gene. Denkbar wäre eine Gewebe oder Stadien spezifische Expression der verschiedenen Gene, wie das von den Globingenen bekannt ist, deren DNA in verschiedenen Geweben auch verschieden methyliert ist (van der Ploeg & Flavell, 1980). Ueber eine Gewebe oder Stadien spezifische Expression der Interferongene ist wenig bekannt, da die meisten Untersuchungen an Blutzellen durchgeführt wurden. Tovey et al. (1986) wiesen bei Mäusen in Milz, Lunge und anderen Geweben Interferon spezifische Transkripte nach. Die DNA des Interferon- α 6 Gens könnte auch in einer Konfiguration vorliegen, die die Transkription des Gens verhindert. Weintraub und Groudine (1976) zeigten am Beispiel der Globingene beim Hühnchen, dass sich die Chromatinstruktur in Geweben, die Globin synthetisieren von solchen, die kein Globin produzieren, in ihrer Deoxyribonuklease1-Sensitivität unterscheiden. Wiederum stellt sich die Frage, wieso nur das Interferon- α 6 Gen inaktiviert sein soll, da das Interferon- α 13 Gen, das sich 18 Kilobasen neben dem Interferon- α 6 Gen befindet, in Leukozyten durch Sendai Virus induzieren lässt (Todokoro et al., 1984). Ein instabiles Transkriptionsprodukt wäre eine weitere Erklärung, wieso nie Interferon- α 6 spezifische Transkripte nachgewiesen wurden.

Das Interferon- α 6 Gen in Maus L-Zellen zu transfektieren und in diesen Zellen zu induzieren, wie das mit dem Interferon- α 1 Gen gemacht wurde (Mantei & Weissmann, 1982), wäre ein Experiment, das über die Expression des Gens Aufschluss geben könnte. Falls wegen mangelnder Stabilität die Interferon- α 6 mRNA nicht nachweisbar wäre, könnten die Regulationssequenzen des Interferon- α 6 Gens vor das Kaninchen β -Globingen gesetzt werden und mit dem hybriden Gen Maus L-Zellen transfektiert und induziert werden, wie das in der Arbeit von Weidle und Weissmann (1983) mit den Regulationssequenzen des Interferon- α 1 Gens gemacht wurde.

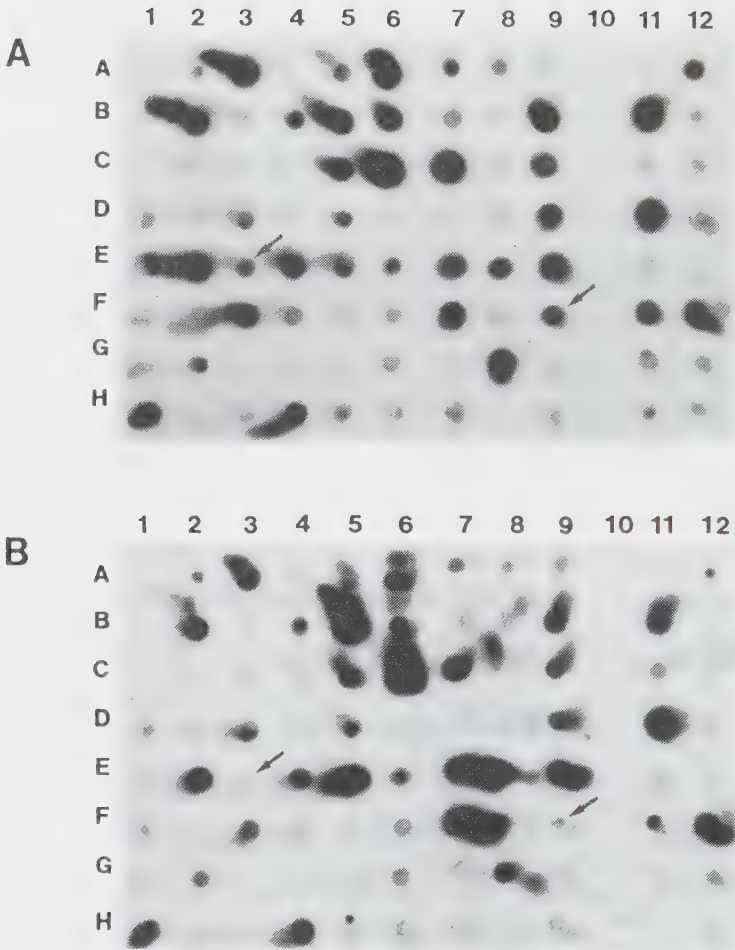
3. CHARAKTERISIERUNG VON STAPHYLOKOKKUS ENTEROTOXIN A INDUZIERTEN GENEN IN MENSCHLICHEN PERIPHEREN LEUKOZYTEN

3.1. Identifikation von vier cDNA Klonen

Poly(A)⁺-RNA aus Staphylokokkus Enterotoxin A induzierten peripheren Leukozyten (im folgenden als "induzierte" RNA bezeichnet) wurde auf einem Sucrosegradienten fraktioniert. Ausgehend von Poly(A)⁺-RNA, die eine Grösse von 1000 - 2000 Nukleotiden hatte, wurde eine cDNA Bank angelegt. Die doppelsträngige cDNA wurde mittels "G/C-tailing" in die PstI-Stelle des Plasmids pBR322 ligiert und anschliessend in E.coli SK1592 transfektiert (Villa-Komaroff et al., 1978; Nagata et al., 1980a). 2000 Klone wurden einzeln in Mikrotiterplatten aufgezüchtet. Für die Plus-Minus-Hybridisierung (siehe Fig. 4) wurden die Kolonien auf Nitrozellulosefilter übertragen, aufgezüchtet, mit Chloramphenicol behandelt, um den Plasmidgehalt zu erhöhen und anschliessend lysiert (Grunstein & Hogness, 1975). Als Hybridisationsprobe diente radioaktiv markierte einzelsträngige cDNA von ebenfalls grössenselektionierter Poly(A)⁺-RNA entweder aus induzierten oder uninduzierten Zellen (im folgenden als "induzierte" bzw. "uninduzierte" Probe bezeichnet). 35 Klone konnten identifiziert werden, die mit der "induzierten" Probe stärker hybridisierten als mit der "uninduzierten" (siehe Fig. 5). Obwohl der Versuch im Doppel durchgeführt wurde, war es oft schwierig zu entscheiden, ob zwischen den Signalen der beiden Proben ein Unterschied bestand. Darum wurde von den 35 vermeintlich positiven Klonen Plasmid DNA aufgearbeitet, diese



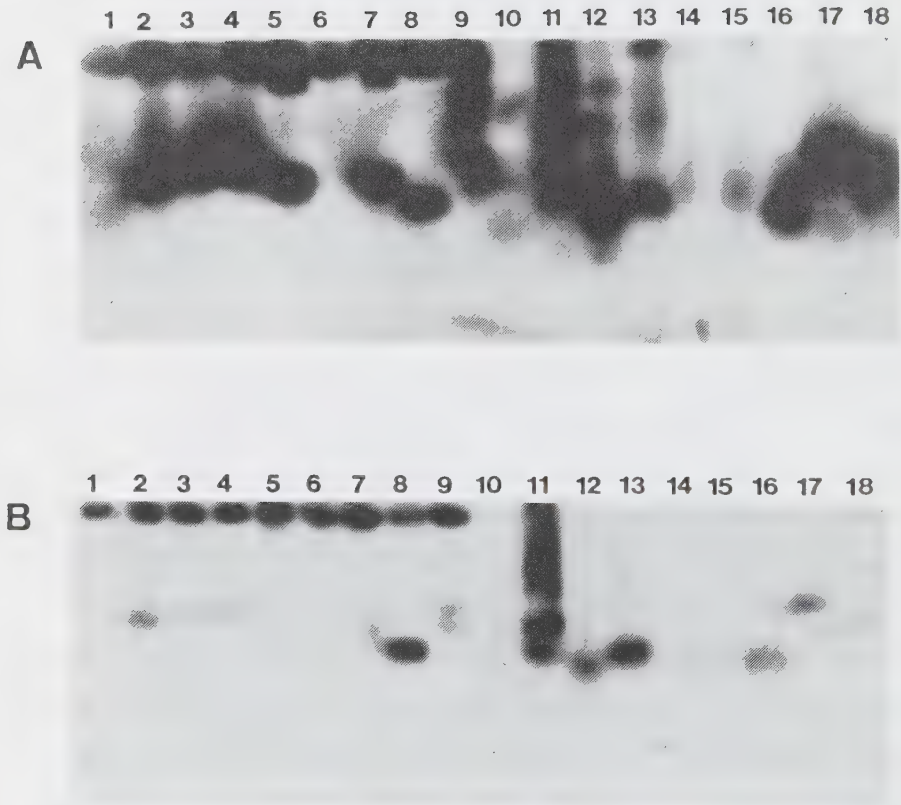
Figur 4. Schematische Darstellung der Plus-Minus-Hybridisierung. Aus Poly(A)⁺-RNA von Staphylokokkuser Enterotoxin A (SEA) induzierten peripheren Leukozyten wurde eine cDNA Bank im Vektor pBR322 synthetisiert (Villa-Komaroff et al., 1978) und die cDNA in E.coli SK 1592 transfektiert. Für die Hybridisierung wurden die Kolonien auf zwei Filtern aufgezüchtet, lysiert und die DNA auf die Filter gebunden. Als Hybridisierungsproben dienten einzelsträngige radioaktiv markierte cDNAs (ss(³²P)cDNA).



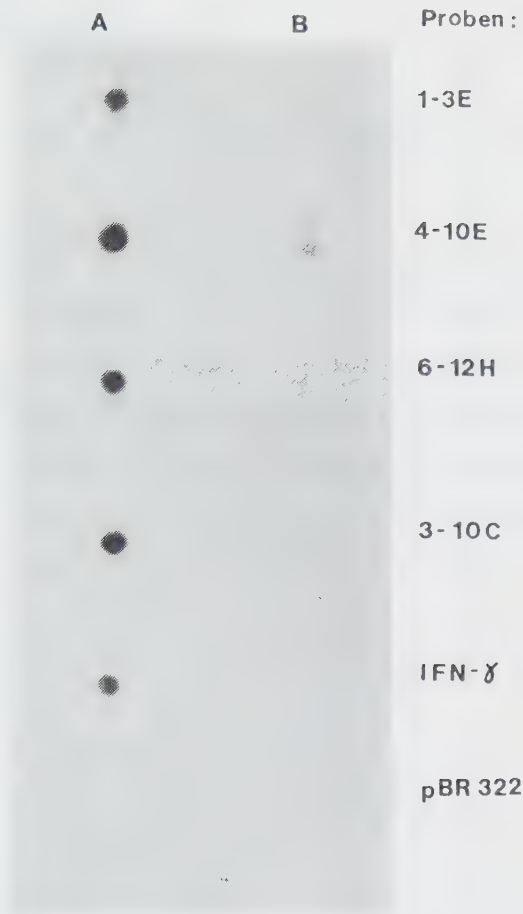
Figur 5. Beispiel einer Plus-Minus-Hybridisierung. 96 Klone einer cDNA Bank (in *E. coli* SK1592) von Poly(A)⁺-RNA aus *Staphylokokkus Enterotoxin A* induzierten peripheren Leukozyten wurden auf zwei Nitrozellulosefilter übertragen, aufgezüchtet, lysiert und fixiert (Grunstein & Hogness, 1975). Radioaktiv markierte einzelsträngige cDNA von Poly(A)⁺-RNA aus induzierten Leukozyten (A) und solche aus uninduzierten Leukozyten (B) dienten als Proben (10^6 cpm/ml) für die Filterhybridisierungen in 4x SET, 0,2 % SDS, 5x Denhardt's Lösung, 0,2 mg/ml Träger DNA, 10 µg/ml Poly(A) bei 68°C während 16 Stunden. Die Filter wurden in 2x SET, 0,2 % SDS bei 68°C und in 3 mM Tris(Base) bei Raumtemperatur gewaschen (Hanahan & Meselson, 1980). Die Autoradiographie mit Fuji RX Film und Wolframat-Verstärkerfolie erfolgte bei -70°C. Die Klone 3E und 9F hybridisieren nur mit der Probe aus den induzierten Leukozyten.

denaturiert, auf Nitrozellulosefilter gebunden und so das Experiment wiederholt. Noch 14 der 35 Klone hybridisierten in diesem Versuch stärker mit der "induzierten" Probe. Um zu zeigen, dass die Probe spezifisch mit der cDNA dieser Klone hybridisierte, wurden die cDNA Inserts mit PstI oder MspI aus dem Plasmid herausgespalten, auf einem Agarosegel aufgetrennt und nach der Methode von Southern (1975) auf Nitrozellulosefilter transferiert, wobei zwei identische Filter hergestellt wurden. Der eine Filter wurde wiederum mit einer radioaktiv markierten einzelsträngigen cDNA komplementär zu "induzierter" RNA und der andere Filter mit einer Probe komplementär zu "uninduzierter" RNA inkubiert. Bei 8 der verbliebenen 14 Klone hybridisierte nur die "induzierte" Probe mit dem cDNA Insert (siehe Fig. 6). Indem jeder dieser 8 cDNA Inserts nick-translatiert (Rigby et al., 1977) und gegen alle 8, auf Filtern fixierte, Inserts hybridisiert wurde, zeigte sich, dass einmal drei und zweimal zwei Inserts miteinander hybridisierten und somit dieselbe oder sehr ähnliche Sequenzen haben müssen. Ausgehend von 2000 Kolonien wurden also 4 verschiedene cDNAs identifiziert, die Genen entsprechen, die in peripheren Leukozyten durch Staphylokokkus Enterotoxin A induziert werden. Die Klone mit je dem längsten Insert waren 1-3E, 3-10C, 4-10E und 6-12H. Wie in Figur 7 gezeigt wird, hybridisieren die cDNA Inserts der vier Klone viel stärker mit der Poly(A)⁺-RNA aus induzierten Zellen (vergl. auch Fig. 10 und Fig. 15).

Da die cDNA Bank mit RNA von einer Länge von 1000 - 2000 Nukleotiden gemacht wurde, waren die cDNA Inserts zu kurz



Figur 6. Verifikation der positiven Klone der Plus-Minus-Hybridisierung (siehe Fig. 5). Von den Klonen, die in der Kolonienhybridisierung nur mit der "induzierten" Probe hybridisierten, wurde Plasmid DNA mit PstI (Reihe 2-9) oder mit MspI (Reihe 11-18) gespalten, auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrozellulosefilter transferiert (Southern, 1975). In der Reihe 1 und 10 ist der mit PstI bzw. MspI gesplattene Vektor pBR322 aufgetragen. Die anschliessende Hybridisierung erfolgte nach demselben Protokoll wie die Kolonienhybridisierung. Die Proben für Filter A und B waren radioaktiv markierte cDNAs von Poly(A)⁺-RNA aus induzierten bzw. uninduzierten Leukozyten.



Figur 7. Hybridisierung von Poly(A)⁺-RNA aus Staphylokokkus Enterotoxin A induzierten (A) und uninduzierten (B) peripheren Leukozyten mit den cDNA Inserts der positiven Klone der Plus-Minus-Hybridisierung. Die RNA wurde denaturiert (10 Minuten bei 50°C in 20 mM Methylquecksilberhydroxid, 50 mM Borsäure, 5 mM Natriumborat, 10 mM Natriumsulfat, 1 mM EDTA) und je 0,5 μ g auf einen Nitrozellulosefilter aufgetragen. Als Proben (10⁵ cpm/ml) für die Hybridisierung (in 50 % Formamid, 5x SSC, 50 mM Natriumphosphat (pH 6.4), 0,1 % SDS, 1x Denhardt's Lösung, 0,2 mg/ml Träger DNA, 50 μ g/ml Träger RNA bei 42°C während 16 Stunden) wurden die nick-translatierten (Rigby et al., 1977) cDNA Insert der Klone 3-10C, 6-12H, 4-10E und 1-3E verwendet. Als Kontrollen dienten der nick-translatierte Vektor pBR322 und der nick-translatierte Interferon- γ cDNA Insert (von Dr. A. Fujisawa zur Verfügung gestellt). Das Waschen der Filter erfolgte in 0,3x SSC, 0,1 % SDS bei 60°C.

(400-600 Basenpaare), um vollständigen Kopien der Poly(A)⁺-RNA zu entsprechen. Es wurde daher eine neue cDNA Bank, diesmal nach der Methode von Okayama und Berg (1982), jedoch unter Verwendung des Vektors pHG327 (Staeheli et al., 1986), hergestellt. Durch Kolonienhybridisierungen mit den einschlägigen nick-translatierten Proben konnten Klone isoliert werden, die 1-3E, 3-10C, 4-10E und 6-12H entsprachen, deren cDNA-Inserts aber bedeutend länger waren. So war die längste 1-3E entsprechende cDNA etwa 1000, die 3-10C entsprechende 1800, die 4-10E entsprechende 1000 und die 6-12H entsprechende 700 Basenpaare lang. Zwei Klone, 1-3E und 3-10C, wurden im Verlaufe der Arbeit noch weiter charakterisiert.

3.2. Der cDNA Klon 1-3E

3.2.1. Resultate

A. Die Sequenz

Die Sequenz der cDNA im Klon 1-3E wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert (1977) und derjenigen von Sanger et al. (1977) bestimmt (siehe Fig. 8). Aus unbekannten Gründen fehlt der cDNA am 5'-Ende eine Oligo(G/C)-Sequenz, wie sie bei der Klonierungsmethode von Okayama und Berg (1982) entstehen sollte. Die cDNA Sequenz grenzt unmittelbar an die BamHI-Stelle des Vektors pHG327. Dem ersten ATG Triplet (Position 8), welches meistens als Initiationscodon dient (Kozak, 1978), folgt das grösste offene Leseraster bis zur Terminationsstelle TAA (Position 749). Im Leseraster (-1) folgt dem ersten ATG (Position 430) nach 99 Basenpaaren ein Terminationstriplet (Position 532) und im Leseraster (+1) befindet sich 63 Basenpaare nach dem ersten Initiationstriplet (Position 57) ein Stopcodon (Position 123). Dem grössten offenen Leseraster folgt eine 3'-unübersetzte Sequenz von 186 Basenpaaren, an die sich eine Poly(A/T)-Sequenz von mindestens 100 Basenpaaren anschliesst. Eine typische AATAAA Sequenz, wie sie vielfach 11 bis 26 Basenpaare vor der Polyadenylierungsstelle von eukaryotischen mRNAs vorkommt (Proudfoot & Brownlee, 1976), befindet sich bei Position 911 bis 916. In der 3'-unübersetzten Region kommt eine identische Sequenz von 59 Basenpaaren (siehe Fig 8.) zwischen Position 795 und 853 und Position 865 und 923 vor. Um wieviele Nukleotide die cDNA am 5'-Ende kürzer ist als die entsprechende mRNA, kann nicht genau angegeben werden. Die

100 Bp

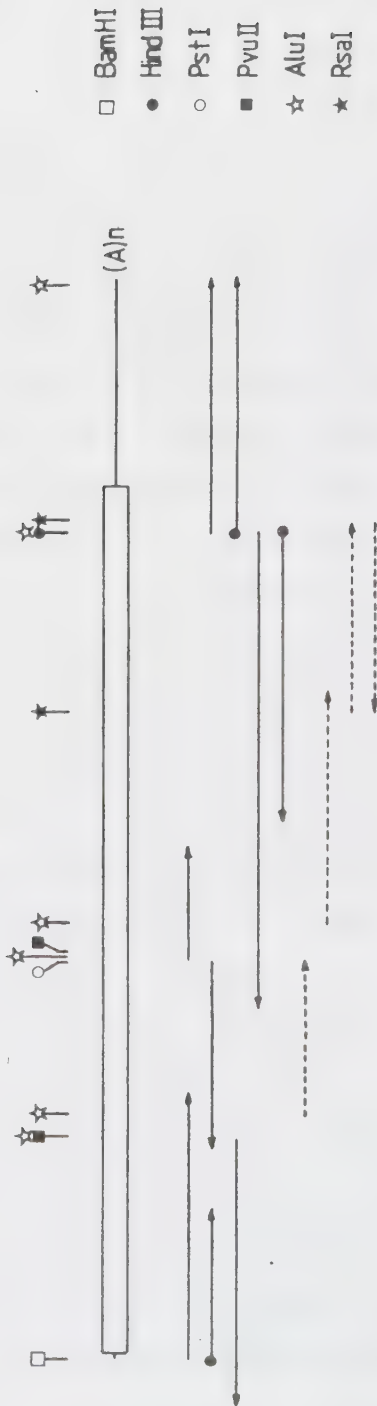


Fig. 8a

Figur 8. Sequenzbestimmung des cDNA Klons 1-3E. a. Strategie. Von Restriktionsfragmenten, die entweder am 5'-Ende (—) oder am 3'-Ende (—) radioaktiv markiert waren, wurde die Sequenz nach der Methode von Maxam und Gilbert (1977) bestimmt. In M13 mp9 (Messing & Vieira, 1982) klonierte Fragmente (-----) wurden nach der Methode von Sanger et al. (1977) sequenziert. b. Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Numerierung der Nukleotide beginnt mit dem ersten Nukleotid nach der BamHI-Stelle des Vektors pHG327 (Staeheli et al., 1986), die der Aminosäuren mit dem ersten Methionin. Unterstrichen sind im kodierenden Bereich die beiden potentiellen N-Glykosylierungsstellen (Marshall, 1972) und im nicht-kodierenden Bereich die 59 Basenpaare, die wiederholt sind.

Fig.8b

1
 TGAGAAGATGCAACCAATCCTGCTTCTGCTGGCCTTCCTCCTGCTGCCCAGGGCAGATGC 60
 MetGlnProIleLeuLeuLeuLeuAlaPheLeuLeuLeuProArgAlaAspAl
 1 10

61
 AGGGGAGATCATCGGGGACATGAGGCCAAGCCCCACTCCCGCCCCCTACATGGCTTATCT 120
 aGlyGluIleIleGlyGlyHisGluAlaLysProHisSerArgProTyrMetAlaTyrLe
 20 30

121
 TATGATCTGGGATCAGAAGTCTCTGAAGAGGTGCGGTGGCTTCCTGATACAAGACGACTT 180
 uMetIleTrpAspGlnLysSerLeuLysArgCysGlyGlyPheLeuIleGlnAspAspPh
 40 50

181
 CGTGCTGACAGCTGCTCACTGTTGGGGAAGCTCCATAAAATGTCACCTTGGGGGCCACAA 240
 eValLeuThrAlaAlaHisCysTrpGlySerSerIleAsnValThrLeuGlyAlaHisAs
 60 70

241
 TATCAAAGAACAGGAGCCGACCCAGCAGTTTATCCCTGTGAAAAGACCCATCCCCATCC 300
 nIleLysGluGlnGluProThrGlnGlnPheIleProValLysArgProIleProHisPr
 80 90

301
 AGCCTATAATCCTAAGAACTTCTCCAACGACATCATGCTACTGCAGCTGGAGAGAAAGGC 360
 oAlaTyrAsnProLysAsnPheSerAsnAspIleMetLeuLeuGlnLeuGluArgLysAl
 100 110

361
 CAAGCGGACCAGAGCTGTGCAGCCCCCTCAGGCTACCTAGCAACAAGGCCCAGGTGAAGCC 420
 aLysArgThrArgAlaValGlnProLeuArgLeuProSerAsnLysAlaGlnValLysPr
 120 130

421
 AGGGCAGACATGCAGTGTGGCCGGCTGGGGGCAGACGGCCCCCTGGGAAACACTCACA 480
 oGlyGlnThrCysSerValAlaGlyTrpGlyGlnThrAlaProLeuGlyLysHisSerHi
 140 150

481
 CACACTACAAGAGGTGAAGATGACAGTGCAGGAAGATCGAAAGTGCGAATCTGACTTACG 540
 sThrLeuGlnGluValLysMetThrValGlnGluAspArgLysCysGluSerAspLeuAr
 160 170

541
 CCATTATTACGACAGTACCATTGAGTTGTGCGTGGGGGACCCAGAGATTAAGAACTTC 600
 gHisTyrTyrAspSerThrIleGluLeuCysValGlyAspProGluIleLysLysThrSe
 180 190

Fig.8b (Forts.)

601 CTTTAAGGGGACTCTGGAGGCCCTCTTGTGTGTAACAAGGTGGCCCAGGGCATTGTCTC 660
 rPheLysGlyAspSerGlyGlyProLeuValCysAsnLysValAlaGlnGlyIleValSe
 200 210

661 CTATGGACGAAACAATGGCATTGCCTCCACGAGCCTGCACCAAAGTCTCAAGCTTTGTACA 720
 rTyrGlyArgAsnAsnGlyMetProProArgAlaCysThrLysValSerSerPheValHi
 220 230

721 CTGGATAAAGAAAACCATGAAACGCTACTAACTACAGGAAGCAAATAAGCCCCGCTGT 780
 sTrpIleLysLysThrMetLysArgTyr
 240 247

781 AATGAAACACCTCTCTGGAGCCAAGTCCAGATTTACACTGGGAGAGGTGCCAGCAACTG 840

841 AATAAATACCTCTCCCAGTGTAATCTGGAGCCAAGTCCAGATTTACACTGGGAGAGGTG 900

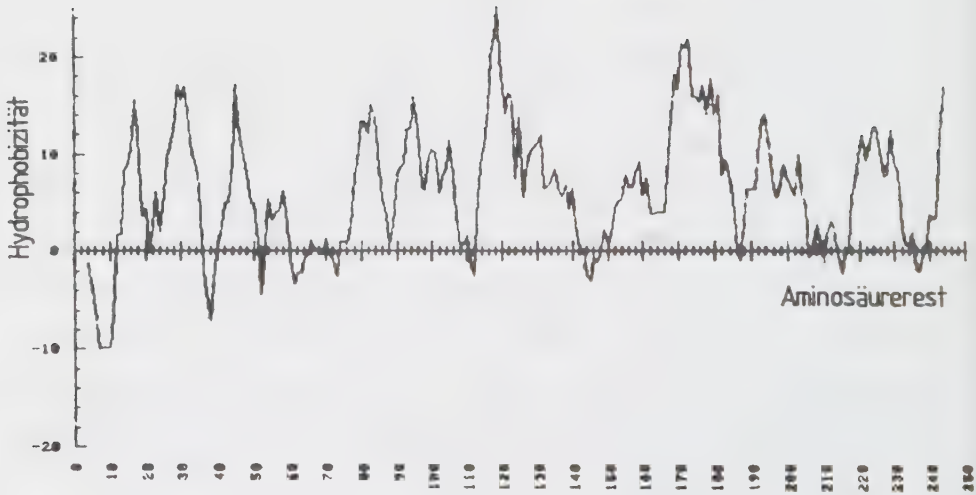
901 CCAGCAACTGAATAAATACCTCTTAGCTGAGTGG (A)n

Northern-Analyse (siehe Fig. 10) zeigte, dass die mRNA etwa 1150 Nukleotide lang ist. Die cDNA ohne das Poly(A/T)-Ende ist 934 Basenpaare lang. Da die Poly(A)-Schwänze von mRNAs ungefähr 200 Nukleotide lang sind (Mendecki et al., 1972), dürften am 5'-Ende der cDNA nicht mehr als etwa 20 Basenpaare fehlen. Da das Leseraster gegen das 5'-Ende hin offen ist, ist jedoch nicht auszuschliessen, dass das ATG Triplet bei Position 8 nicht dem Initiationscodon entspricht. Ein Vergleich der Sequenz um das ATG-Triplet bei Position 8 (AGAAGATGC) mit der Konsensussequenz CC(A/G)CCATG(G) (Kozak, 1984a) zeigt eine Uebereinstimmung im Adenin, drei Basenpaare vor dem Initiationscodon. Bei 79 % aller untersuchten Initiationsstellen befindet sich ein Adenin (bei 18 % ein Guanin) an dieser Stelle (Kozak, 1984a). Steht ein Cytosin anstelle eines Adenins an dieser Position, so vermindert diese Aenderung der Sequenz die Effizienz der Translation um das Fünfzehnfache (Kozak, 1984b). Die anderen Positionen (ausser dem Initiationstriplet) der Konsensussequenz sind weniger stark konserviert, eine Präferenz für Cytosin ist jedoch feststellbar (Kozak, 1984a). Einen weiteren Hinweis, dass es sich beim ATG Triplet bei Position 8 um das Initiationscodon handelt, gibt die Analyse der Proteinsequenz bezüglich hydrophober Regionen. Wie Figur 9 zeigt, ist das vermeintliche N-terminale Ende des Proteins hydrophob, wie das bei Proteinen mit einem Signalpeptid der Fall ist (von Heijne, 1985).

*

B. Northern-Analyse

Poly(A)⁺-RNA aus Staphylokokkus Enterotoxin A induzierten und uninduzierten peripheren Leukozyten des Menschen wurde auf



Figur 9. Hydrophobizitätskurve der 1-3E Aminosäuresequenz. Die Hydrophobizität wurde nach den Werten von Heijnes (1981) ermittelt. Aufgetragen ist der Mittelwert (in kJ/Mol) von jeweils sieben aufeinanderfolgenden Aminosäuren, wobei eine Sequenz umso hydrophober ist, je kleiner der Wert ist.



Figur 10. Nachweis von 1-3E spezifischer RNA in Staphylokokkus Enterotoxin A induzierten Leukozyten. Je 5 μg Poly(A)⁺-RNA aus Staphylokokkus Enterotoxin A induzierten, peripheren Leukozyten (Bahn 1) und uninduzierten Leukozyten (Bahn 2) wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter transferiert (Maniatis et al., 1982). Die Hybridisierung erfolgte mit dem nick-translatierten 5'BamHI-HindIII Fragment der 1-3E cDNA (5×10^5 cpm/ml) in 50 % Formamid, 5x SSC, 20 mM PIPES (pH 6.5), 0,5 % SDS, 2x Denhardt's Lösung, 0.2 mg/ml Träger DNA während 16 Stunden bei 42°C. Der Filter wurde in 0.3x SSC, 0.5 % SDS bei 60°C gewaschen. Als Grössenmarker wurden radioaktiv markierte SP6 RNAs mit bekannten Molekulargewichten (in Nukleotiden) aufgetragen.

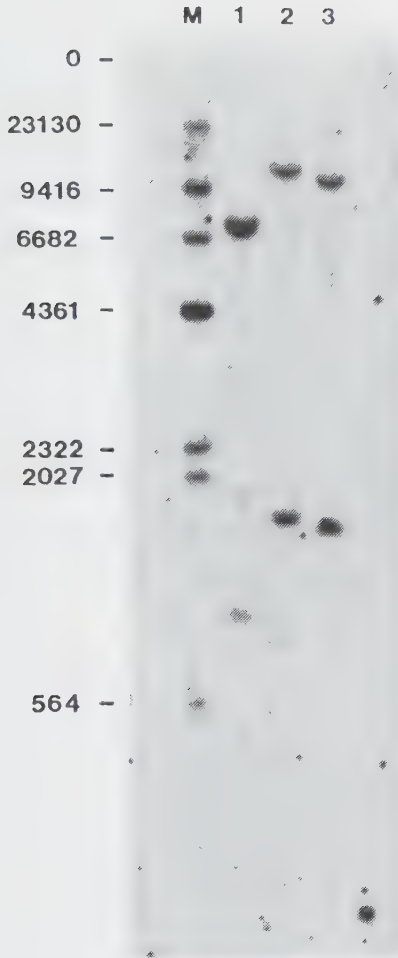
einem Agarosegel aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter transferiert (Maniatis et al., 1982). Als Hybridisierungsprobe diente das nick-translatierte 5'BamHI-HindIII Fragment der 1-3E cDNA. Wie die Northern-Analyse zeigt (siehe Fig. 10), enthalten die induzierten Leukozyten mindestens zehnmal mehr 1-3E spezifische Transkriptionsprodukte als die uninduzierten Leukozyten. Die Bande auf dem Autoradiogramm entspricht einer etwa 1150 Nukleotiden langen RNA.

C. Charakterisierung des 1-3E Gens mittels Southern-Analyse

Menschliche chromosomale DNA aus Leukozyten wurde mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen (EcoRI, BglII und BamHI) verdaut, in einem Agarosegel aufgetrennt und nach der Methode von Southern (1975) auf einen Nitrozellulosefilter transferiert. Als Hybridisationsprobe diente der nick-translatierte Insert vom cDNA Klon 1-3E (siehe Fig. 10). Nach Verdauung mit EcoRI hybridisieren DNA Fragmente von 7000 und 1000, mit BglII solche von 11'500 und 1'700 und mit BamHI solche von 10'000 und 1'600 Basenpaar Länge mit der 1-3E spezifischen Probe. Da immer nur zwei Fragmente hybridisieren, enthält die 1-3E cDNA keine repetitiven Sequenzen, wie z.B. Alu-Sequenzen (Houck et al., 1979). Das der 1-3E cDNA entsprechende Gen dürfte auch keiner grossen Genfamilie, wie beispielsweise die Interferon-Gene (Nagata et al., 1980 b), angehören, da sonst mehrere Banden erwartet würden.

D. Sequenzvergleich

Der Vergleich der Proteinsequenz von 1-3E mit bekannten Proteinen zeigte, dass die 1-3E Sequenz eine Homologie zu



Figur 11. Southern Analyse chromosomaler DNA mit einer 1-3E cDNA Probe. Menschliche zelluläre DNA aus Leukozyten wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI (Bahn 1), BglII (Bahn 2) oder BamHI (Bahn 3) verdaut. Je 5 μ g wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter transferiert (Southern, 1975). Die Hybridisierung mit dem nick-translatierten 1-3E cDNA Insert (3×10^6 cpm/ml) erfolgte in 5x SET, 0,2 % SDS, 1x Denhardt's Lösung, 0,2 mg/ml Träger DNA bei 68°C während 16 Stunden. Der Filter wurde in 0,2x SSC, 0,2 % SDS bei 68°C gewaschen. Als Grössenmarker (Bahn M, in Basenpaaren) wurde radioaktiv markierte, mit HindIII gesplattene λ -DNA aufgetragen.

Serinproteasen besitzt. Die grösste Homologie, 47 % besteht zur sog. atypischen Mastzell spezifischen Serinprotease von Ratten (RMCPII; Woodbury et al., 1978). Die Homologie zu anderen Serinproteasen von Ratten beträgt 39 % für pankreatisches Trypsin-1 (Craik et al., 1984), 34 % für pankreatisches Kallikrein (Swift et al., 1982), 29 % für pankreatische Elastase-1 (MacDonald et al., 1982) und 28 % für Chymotrypsin B (Bell et al., 1984; siehe Fig. 12).

Das Protein 1-3E enthält zwei Sequenzen von Typ Asn-X-Ser/Thr, die als N-Glykosylierungsstellen in Frage vorkommen (Marshall, 1972). Die eine Sequenz Asn-Val-Thr, befindet sich zwischen Aminosäure 71 und 73 und die andere, Asn-Phe-Ser, zwischen Aminosäure 104 und 106 (siehe Fig. 8).

3.2.2. Diskussion

Zur Familie der Serinproteasen gehören einerseits solche, die Proteine im Magen-Darm-Trakt verdauen und andererseits solche, die zur Aktivierung von Proteinen und Peptiden notwendig sind. Zur Gruppe der Verdauungsenzyme gehören Trypsin, Chymotrypsin und Elastase. Proteasen, die andere Proteine, vielfach auch Proteasen, aktivieren, sind beispielsweise die Kallikreine, die Proteasen der Blutgerinnung und diejenigen der Komplementreaktion. Ihre Spezifitäten sind sehr verschieden. So können die Proteasen, die für die Blutgerinnung oder die Komplementreaktion (für einen Ueberblick siehe Jackson & Nemerson, 1980 bzw. Reid & Porter, 1981) verantwortlich sind, nur die nächstfolgende Protease in der Kaskade spalten und dadurch aktivieren. Die Proteasen, die für die Verdauung von Nahrungsmitteln zuständig sind, sind viel weniger spezifisch, Trypsin beispielsweise spaltet Proteine immer nach einem Lysin oder Arginin. Neben den funktionellen Unterschieden gibt es auch strukturelle Unterschiede. Trypsin, Chymotrypsin und Elastase sind relativ kleine Proteine mit Molekulargewichten von rund 25'000. Die Serinproteasen der Komplementreaktion oder der Blutgerinnung dagegen sind mindestens doppelt so gross und enthalten neben den Sequenzen, die für die Proteaseaktivität notwendig sind, noch weitere, die beispielsweise mit Cofaktoren interagieren. Die Sequenzen, die für die Proteaseaktivität verantwortlich sind, liegen immer im C-terminalen Teil der Primärstruktur und sind zu den anderen Serinproteasen homolog (Neurath, 1984).

Das Protein, für das die 1-3E cDNA kodiert, zeigt nicht nur allgemein grosse Homologie zu bekannten Serinproteasen, sondern erfüllt auch viele Kriterien, die Serinproteasen auszeichnen. Die vermeintliche Serinprotease 1-3E gehört sicher zu den kleineren Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin oder Elastase. Die Länge der 1-3E mRNA schliesst ein grösseres Protein aus. Bei allen sequenzierten Serinproteasen, bis auf eine Ausnahme, bilden die drei Aminosäuren Histidin 45, Asparaginsäure 102 und Serin 199 (Numerierung wie in Fig. 12) die aktive Stelle des Enzyms. Die Ausnahme bildet das submaxillare Tonin der Ratte, bei dem die Asparaginsäure durch ein Leucin ersetzt ist (Lazure et al., 1984). Die Sequenz von 1-3E enthält an den homologen Stellen ebenfalls die drei Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und Serin (siehe Fig. 12). An der primären Substratbindungsstelle ist noch eine Aminosäure (Position 193 in Fig 12) beteiligt. Bei Trypsin und Trypsin ähnlichen Proteasen ist es eine Asparaginsäure und bei Chymotrypsin und seinen Verwandten ein Serin. RMCPII enthält an der homologen Stelle ein Alanin, was die Bindungsstelle, im Vergleich zu den anderen Serinproteasen, apolarer macht. Die Sequenz von 1-3E enthält ein Threonin an der entsprechenden Stelle. Stark konserviert sind auch die Cysteine, die Disulfidbrücken bilden und wesentlich zur Sekundärstruktur beitragen. Trypsin hat sechs Disulfidbrücken, Chymotrypsin deren fünf, Elastase vier und RMCPII drei. Die 1-3E Sequenz enthält Cysteine an homologen Stellen zur RMCPII Sequenz, von der bekannt ist, welche Cysteine miteinander Disulfidbrücken bilden. Es sind dies Cys 30 mit Cys 46, Cys 136 mit Cys 205 und Cys 168 mit Cys 184 (Woodbury et al., 1978). Sowohl der

RMCP11 wie der 1-3E Sequenz fehlen zwei Cysteine (Position 195 und 225 in Fig. 12), die bei allen anderen Serinproteasen vorkommen und eine Disulfidbrücke bilden (Woodbury & Neurath, 1980). Die 1-3E Sequenz enthält als einzige Serinprotease ein Cystein (Cys 234), das keine Disulfidbindung eingehen kann (Dr. H. Neurath, pers. Mitteilung). Da Zweifel an diesem Befund auftraten, wurde die Sequenz in der fraglichen Region von zwei weiteren cDNA Klonen bestimmt, die beide mit der 1-3E cDNA hybridisierten. Beide Klone hatte dieselbe Sequenz wie der Klon 1-3E und bestätigten somit das Cystein bei Position 234 in der Proteinsequenz. Proteasen, die in ihrer inaktiven Form von Zellen ausgeschieden werden, enthalten am N-terminalen Ende ein Signalpeptid, wie die meisten Proteinen, die von eukaryotischen Zellen ausgeschieden werden (Blobel, 1975; Blobel, 1979). Die Signalsequenz wird noch im endoplasmatischen Retikulum vom primären Translationsprodukt abgespalten. Zur Aktivierung von Serinproteasen müssen nochmals einige Aminosäuren, die das sogenannte Aktivierungspeptid bilden, abgespalten werden. Bei den kleinern Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin oder Elastase schliessen die Aminosäuren des Aktivierungspeptides an diejenigen des Signalpeptides an. Die Signalpeptide der einzelnen Serinproteasen sind recht unterschiedlich in Länge und Aminosäurezusammensetzung. Eine Homologie ist nicht ersichtlich, ausser dass die Signalpeptide vielfach eine geladene Aminosäure innerhalb der ersten fünf Aminosäuren enthalten, gefolgt von mindestens neun hydrophoben Aminosäuren, welche genügen, um eine Membran zu durchstossen. Fünf bis acht Aminosäuren vor der Spaltstelle befindet sich oft eine Aminosäure, die eine Helix bricht, wie Glycin oder

Prolin oder solche mit grossen polaren Seitenketten wie Glutamin. Die Aminosäure auf der C-terminalen Seite der Spaltstelle ist meist eine mit einer kleinen ungeladenen Seitenkette (von Heijne, 1985). Die Aktivierungspeptide zeigen keine Gemeinsamkeiten, ausser der Aminosäure an der Spaltstelle, die immer ein Arginin oder Lysin ist. Stärker konserviert sind die ersten vier Aminosäuren der aktiven Proteasen. Die ersten beiden Aminosäuren sind vielfach Valin und/oder Isoleucin, gefolgt von zwei Glycinresten (Aminosäuren 1-4 in Fig. 12). Wie in Figur 9 gezeigt wird, bildet das N-terminale Ende der 1-3E Sequenz eine hydrophobe Region, die einem Signalpeptid entsprechen könnte. Eine Spaltstelle zwischen dem Signalpeptid und einem anschliessenden Aktivierungspeptid ist nur durch Sequenzvergleiche nicht zu bestimmen. Anders die Schnittstelle, die das Aktivierungspeptid von der Protease trennt. Wie andere Proteasen enthält die Sequenz von 1-3E die Aminosäuresequenz Ile-Ile-Glu-Glu (Aminosäuren 1-4 in Fig. 12), die für das N-terminale Ende von Serinproteasen typisch ist. Unterschiedlich ist jedoch die Aminosäure vor der Schnittstelle. Wo bei den anderen Proteasen ein Arginin oder Lysin steht, enthält die 1-3E Sequenz eine Glutaminsäure.

Obwohl RMCPII und die Sequenz von 1-3E viele Gemeinsamkeiten haben, ist nicht anzunehmen, dass 1-3E die RMCPII entsprechende Serinprotease beim Menschen ist. Die Homologie von Proteinen der Ratte, verglichen mit denen des Menschen, ist grösser als die für RMCPII und 1-3E. So beträgt die Homologie beim α -Globin 79 %, beim β -Globin 81 % und bei Proinsulin

85 % bzw. 84 % für Proinsulin-1 respektiv Proinsulin-2 der Ratte (Dayhoff, 1976; Dayhoff, 1978).

Ueber Serinproteasen, die von Blutzellen produziert werden und nicht an der Blutgerinnung oder der Komplementreaktion beteiligt sind, ist nur wenig bekannt. Eine Elastase aus menschlichen Granulozyten wurde auf Grund ihrer enzymatischen Aktivitäten beschrieben (Schechter & Berger, 1967; Harper et al., 1984). Pasternack und Eisen (1985) untersuchten die Aktivität einer Serinesterase in Concanavalin A stimulierten cytotoxischen T-Zellen von Mäusen. Ein Vergleich mit 1-3E ist nicht möglich, da vergleichbare Daten fehlen.

Als nächstes sollte deshalb der Beweis erbracht werden, dass das 1-3E Protein eine Proteaseaktivität hat. Um Fragen nach der Aktivität und Spezifität abzuklären, muss das 1-3E Protein isoliert werden. Mit Hilfe von Antikörpern könnte das Protein verhältnismässig einfach gereinigt werden. Dies ist auch der Grund, wieso versucht wurde, bisher allerdings erfolglos, Antikörper gegen das 1-3E Protein herzustellen (siehe Material und Methoden Abschnitt 11.A.). Im weiteren wäre es interessant zu wissen, welche Blutzellen dieses Protein synthetisieren und was seine physiologische Funktion ist. Um den Induktionsmechanismus zu analysieren, sollte auch das entsprechende Gen kloniert werden. Ein Vergleich der Sequenzen verschiedener Gene, die durch Staphylokokkus Enterotoxin A induziert werden, könnte Hinweise auf die Regulationssequenzen dieser Gene geben.

3.3. Der cDNA Klon 3-10C

3.3.1. Resultate

A. Sequenz

Die Nukleotidsequenz der 3-10C cDNA wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert (1977) bestimmt (siehe Fig. 13). Am 5'-Ende der cDNA befindet sich ein 17 Basenpaare langes G/C-Homopolymer, das auf die Strategie der cDNA Synthese nach Okayama und Berg (1982) zurückzuführen ist. Dem ersten ATG Triplet der Sequenz (Position 91 in Fig. 13) folgt ein offenes Leseraster von 294 Basenpaaren bis zur Terminationsstelle TAA bei Position 388, gefolgt von einer 1249 Basenpaare langen 3'-unübersetzten Sequenz bis zur Polyadenylierungsstelle. Im Leseraster(+1) befindet sich das erste ATG Triplet bei Position 305 und das nächste Stopcodon bei Position 368. Im Leseraster(-1) ist das erste ATG bei Position 189 und das folgende Terminationstriplet bei Position 255. Da das Leseraster mit dem ATG Triplet bei Position 91 gegen das 5'-Ende hin offen ist und nicht bekannt ist, wieviele Nukleotide der cDNA gegenüber der mRNA am 5'-Ende fehlen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Triplet nicht dem Initiationstriplet entspricht, obwohl mehrere Hinweise diese Annahme unterstützen. So zeigt ein Vergleich der Konsensussequenz der Initiationsstelle CC(A/G)CCATG(G) (Kozak, 1984a) mit der entsprechenden Sequenz um das ATG Triplet bei Position 91 TAAACATGA eine Übereinstimmung von zwei Nukleotiden (abgesehen vom ATG). Einen weiteren Hinweis, dass es sich beim ATG bei Position 91 um das Initiationstriplet handelt, gibt die

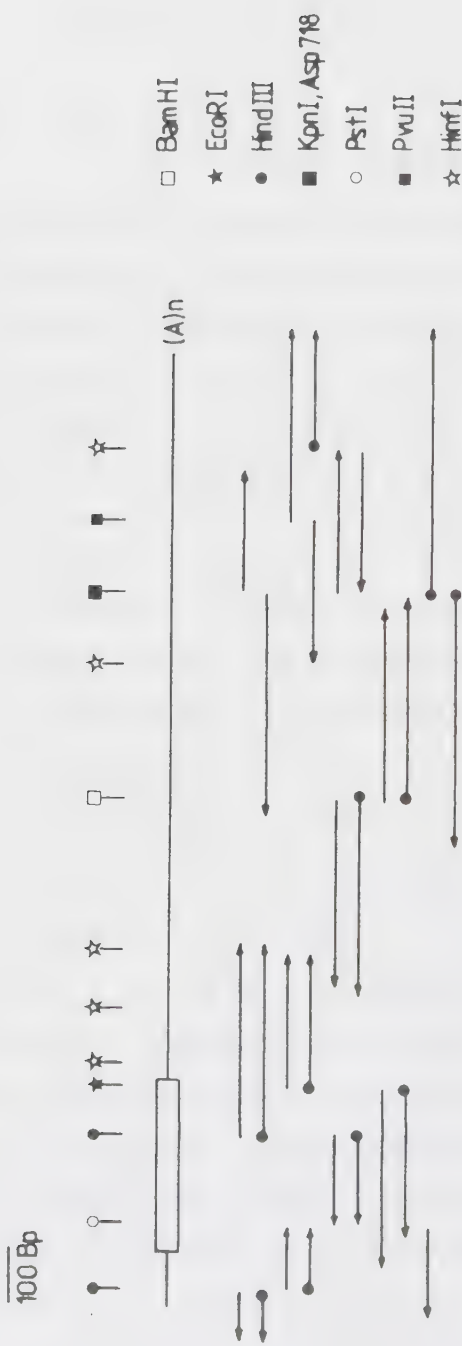


Fig. 13a

Figur 13. Sequenzbestimmung des cDNA Klons 3-10C. a. Strategie. Von Restriktionsfragmenten, die entweder am 5'-Ende (—●—) oder am 3'-Ende (—●—) radioaktiv markiert waren, wurde die Sequenz nach der Methode von Maxam und Gilbert (1977) bestimmt. b. Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Numerierung der Nukleotide beginnt mit dem ersten Nukleotid nach dem 17 Basenpaare langen G/C-Homopolymer, das auf die Strategie der cDNA Synthese nach Okayama und Berg (1982) zurückzuführen ist. Die Numerierung der Aminosäuren beginnt mit dem ersten Methionin. Das vermeintliche Signalpeptid ist unterstrichen.

Fig.13b

1	ACAAACTTTTCAGAGACAGCAGAGCACACAAGCTTCTAGGACAAGAGCCAGGAAGAAACCA	60
61	CCGGAAGGAACCATCTCACTGTGTGTAAACATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCTCTCTTG	120
	<u>MetThrSerLysLeuAlaValAlaLeuLeu</u>	
	<u>1 10</u>	
121	GCAGCCTTTCCTGATTTCTGCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAGTTTGGCCAAGGAGTGCTAAA	180
	<u>AlaAlaPheLeuIleSerAlaAlaLeuCysGluGlyAlaValLeuProArgSerAlaLys</u>	
	<u>20 30</u>	
181	GAACCTTAGATGTCAGTGCATAAAGACATACTCCAAACCTTTCCACCCCAAATTTATCAAA	240
	GluLeuArgCysGlnCysIleLysThrTyrSerLysProPheHisProLysPheIleLys	
	<u>40 50</u>	
241	GAAGTGAAGTGATTGAGAGTGGACCACACTGCGCCAACACAGAAATTATTGTAAAGCTT	300
	GluLeuArgValIleGluSerGlyProHisCysAlaAsnThrGluIleIleValLysLeu	
	<u>60 70</u>	
301	TCTGATGGAAGAGAGCTCTGTCTGGACCCCAAGGAAAACCTGGGTGCAGAGGGTGTGGAG	360
	SerAspGlyArgGluLeuCysLeuAspProLysGluAsnTrpValGlnArgValValGlu	
	<u>80 90</u>	
361	AAGTTTTTGAAGAGGGCTGAGAATTCATAAAAAAATTCATTCTCTGTGGTATCCAAGAAT	420
	LysPheLeuLysArgAlaGluAsnSer	
	<u>99</u>	
421	CAGTGAAGATGCCAGTGAAACTTCAAGCAAATCTACTTCAACACTTCATGTATTGTGTGG	480
481	GTCTGTTGTAGGGTTGCCAGATGCAATACAAGATTCCCTGGTTAAATTTGAATTCAGTAA	540
541	ACAATGAATAGTTTTTCATTGTACCATGAAATATCCAGAACATACTTATATGTAAAGTAT	600
601	TATTTATTTGAATCTACAAAAACAACAAATAATTTTTGAATATAAGGATTTTCCTAGAT	660
661	ATTGCACGGGAGAATATACAAATAGCAAAATTGGGCCAAGGGCCAAGAGAATATCCGAAC	720

Fig.13b (Forts.)

721	TTTAATTTCAAGGAATTGAATGGGTTTGCTAGAATGTGATATTTGAAGCATCACATAAAAA	780
781	TGATGGGACAAATAAATTTTGCCATAAAGTCAAATTTAGCTGGAAATCCTGGATTTTTTTC	840
841	TGTTAAATCTGGCAACCCTAGTCTGCTAGCCAGGATCCACAAGTCCTTGTTCCACTGTGC	900
901	CTTGGTTTCTCCTTTATTCTAAGTGGAAAAAGTATTAGCCACCATCTTACCTCACAGTG	960
961	ATGTTGTGAGGACATGTGGAAGCACTTTAAGTTTTTTCATCATAACATAAATTATTTTCA	1020
1021	AGTGTAACCTATTAACCTATTTATTATTTATGTATTTATTTAAGCATCAAATATTTGTGC	1080
1081	AAGAATTTGGAAAAATAGAAGATGAATCATTTGATTGAATAGTTATAAAGATGTTATAGTA	1140
1141	AATTTATTTTATTTTAGATATTAAATGATGTTTTATTAGATAAATTTCAATCAGGGTTTT	1200
1201	TAGATTAAACAAACAAACAATTGGGTACCCAGTTAAATTTTCATTTAGATAAACAACAA	1260
1261	ATAATTTTTTAGTATAAGTACATTATGTTTATCTGAAATTTTAATTGAACATAACAATCC	1320
1321	TAGTTGATACTCCAGTCTTGTCATTGCCAGCTGTGTTGGTAGTGCTGTGTTGAATTAC	1380
1381	GGAATAATGAGTTAGAACTATTAAAACAGCCAAAACCTCCACAGTCAATATTAGTAATTTT	1440
1441	TTGCTGGTTGAAACTTGTTTATTATGTACAAATAGATTCCTATAATATTTTAAATGAC	1500
1501	TGCATTTTTAAATACAAGGCTTTATATTTTAACTTTAAGATGTTTTTATGTGCTCTCCA	1560

Fig.13b (Forts.)

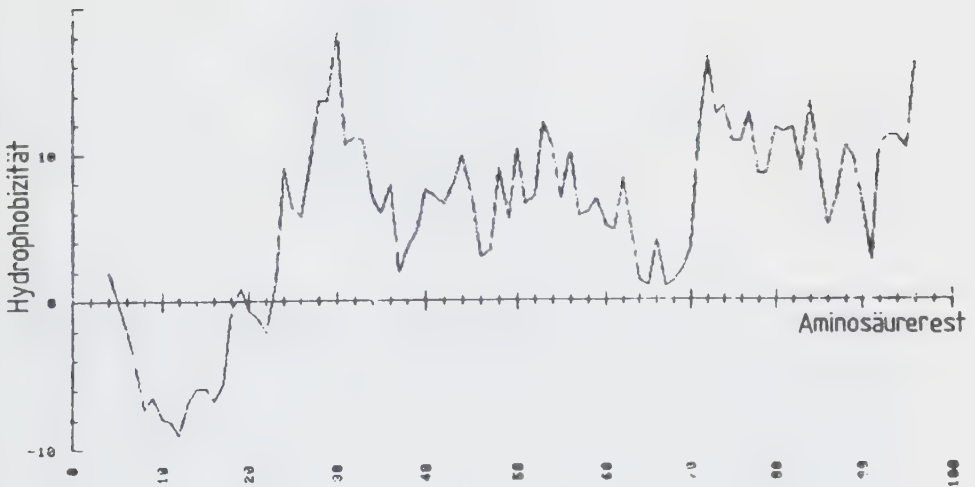
1561 AATTTTTTTTACTGTTTCTGATTGTATGGAATATAAAAGTAAATATGAACATTTAAA 1620

1621
TATAATTTGTTGTCAAAGT(A)_n

Analyse der Proteinsequenz bezüglich hydrophober Regionen. Wie Figur 14 zeigt, ist das vermeintliche N-terminale Ende des Proteins hydrophob, wie das für Proteine mit einem Signalpeptid zutrifft (von Heijne, 1985). Ein Signalpeptid der 3-10C Sequenz von 22 Aminosäuren erfüllt die Kriterien, die von Heijne (1984, 1985) für Signalpeptide aufstellte. Nach der "(-3, -1)-Regel" (von Heijne, 1984) sollte an der Position -1 (gezählt von der Spaltstelle) ein Alanin, Glycin, Serin, Cystein, Threonin oder Glutamin sein. Aromatische (Phe, His, Tyr, Trp), geladene (Asp, Glu, Lys, Arg) oder grosse polare (Asn, Gln) Aminosäuren sind häufig bei Position -2 und selten bei Position -3. In Position +1 befindet sich oft ein Alanin. In der ganzen Region von -3 bis +1 sollte kein Prolin vorkommen. Diese Kriterien werden von der Sequenz Cys(-3)-Glu(-2)-Gly(-1)-Ala(+1) erfüllt, die sich von Position 20 bis 23 der 3-10C Sequenz (siehe Fig. 13) erstreckt. Der typischen AATAAA Sequenz, 11 bis 26 Basenpaare vor Polyadenylierungsstellen (Proudfoot & Brownlee, 1976), dürfte bei der 3-10C cDNA die Sequenz AATATA (Nukleotid 1619 - 1624) entsprechen. Dieselbe Sequenz (AATATA) befindet sich beispielsweise 15 Basenpaare vor einer Polyadenylierungsstelle des α -Amylasegens der Maus (Tosi et al., 1981).

B. Northern Analyse

Poly(A)⁺-RNA aus Staphylokokkus Enterotoxin A induzierten und uninduzierten peripheren Leukozyten des Menschen wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter transferiert (Maniatis et al., 1982). Als Hybridisierungsprobe diente das nick-translatierte 5'BamHI-BamHI Fragment der



Figur 14. Hydrophobizitätskurve der 3-10C Aminosäuresequenz. Die Hydrophobizität wurde nach den Werten von Heijnes (1981) ermittelt. Aufgetragen ist der Mittelwert (in kJ/Mol) von jeweils sieben aufeinanderfolgenden Aminosäuren, wobei eine Sequenz umso hydrophober ist, je kleiner der Wert ist.

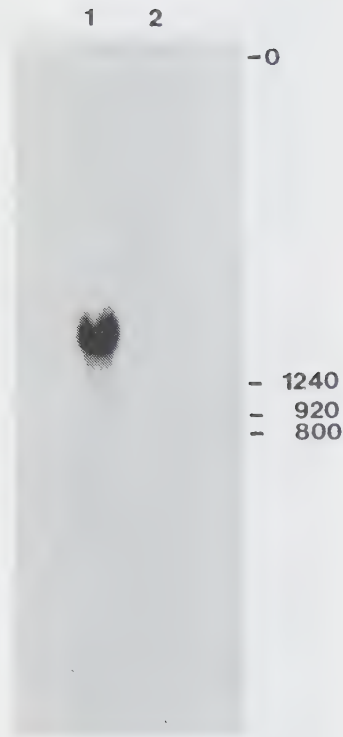
3-10C cDNA. Wie die Northern Analyse zeigt (siehe Fig. 15), enthalten die induzierten Leukozyten mindestens zehnmal mehr 3-10C spezifische Transkriptionsprodukte als die uninduzierten Leukozyten. Die Bande auf dem Autoradiogramm entspricht einer RNA von 1800 bis 1900 Nukleotiden Länge.

C. Charakterisierung des 3-10C Gens mittels Southern-Analyse

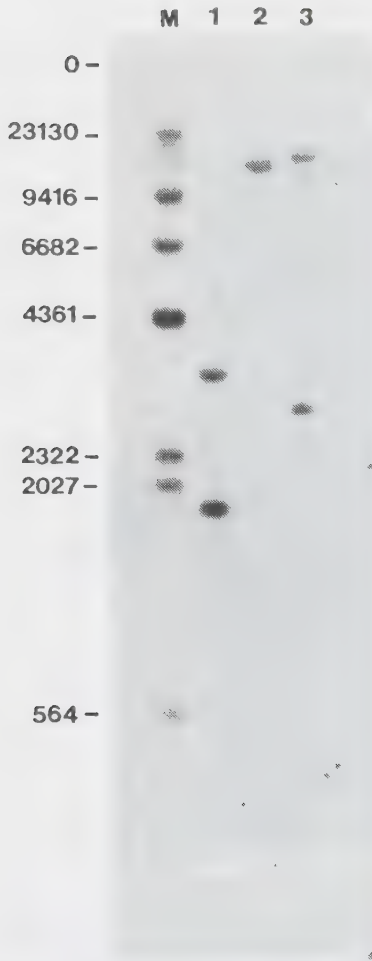
Menschliche chromosomale DNA aus Leukozyten wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI, BglII und BamHI verdaut, in einem Agarosegel aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter transferiert (Southern, 1975). Nick-translatierte 3-10C cDNA diente als Hybridisationsprobe (siehe Fig. 16). Zwei EcoRI-Fragmente von 3400 und 1800, ein BglII-Fragment von 13'000 und zwei BamHI-Fragmente von 17'000 und 3000 Basenpaaren Länge hybridisierten mit der radioaktiv markierten Probe. Da die cDNA sowohl eine EcoRI- als auch eine BamHI-, aber keine BglII-Schnittstelle enthält, kann keine Aussage gemacht werden, ob das Gen Introns enthält oder nicht. Sicher gehört das Gen aber keiner grösseren Genfamilie an, da sonst mehr als nur eine oder zwei Banden erwartet würden. Im weiteren befinden sich keine hochrepetitiven Sequenzen in der cDNA. Andernfalls müssten mehr Banden auftreten.

D. Sequenzvergleich

Der Vergleich der 3-10C Sequenz zu bekannten Proteinen (siehe Fig. 17) ergab eine Homologie zu menschlichem β -Thromboglobulin (Begg et al., 1978) von 42 %, zu menschlichem Platelet Factor 4 (Walz et al., 1977; Deuel et al., 1977) von 35 % und zu menschlichem γ IP-10 von 24 % (Luster et al., 1985). Die



Figur 15. Nachweis von 3-10C spezifischer RNA in Staphylokokkus Enterotoxin A induzierten Leukozyten. Je 5 μg Poly(A)⁺-RNA aus Staphylokokkus Enterotoxin A induzierten peripheren Leukozyten (Bahn 1) und uninduzierten Leukozyten (Bahn 2) wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter transferiert (Maniatis et al., 1982). Die Hybridisierung erfolgte mit dem nick-translatierten 5'BamHI-BamHI Fragment der 3-10C cDNA (5×10^5 cpm/ml) in 50 % Formamid, 5x SSC, 20 mM PIPES (pH 6.5), 0.5 % SDS, 2x Denhardt's Lösung, 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Träger DNA während 16 Stunden bei 42°C. Der Filter wurde in 0.3x SSC, 0.5 % SDS bei 60°C gewaschen. Als Grössenmarker dienten radioaktiv markierte SP6 RNAs mit bekannten Molekulargewichten (in Nukleotiden angegeben).

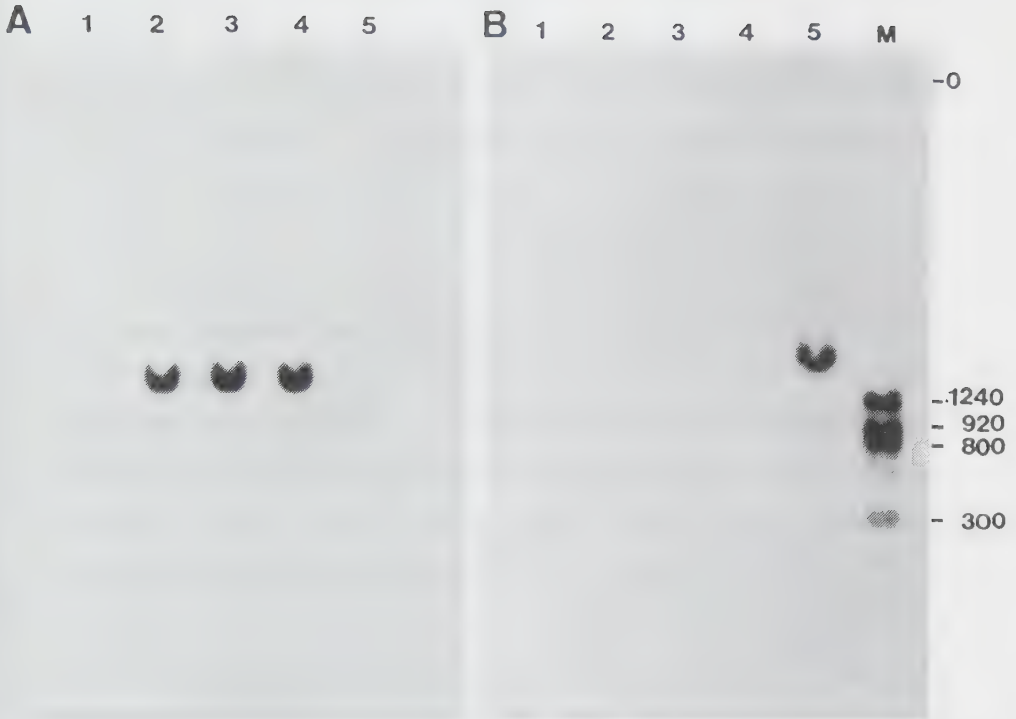


Figur 16. Southern Analyse chromosomaler DNA mit einer 3-10C cDNA Probe. Menschliche zelluläre DNA aus Leukozyten wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI (Bahn 1), BglII (Bahn 2) oder BamHI (Bahn 3) verdaut. Je 5 μ g wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter transferiert (Southern, 1975). Die Hybridisierung mit dem nick-translatierten 3-10C cDNA Insert (3×10^6 cpm/ml) erfolgte in 5x SET, 0,2 % SDS, 1x Denhardt's Lösung, 0.2 mg/ml Träger DNA bei 68°C während 16 Stunden. Der Filter wurde in 0.2x SSC, 0.2 % SDS bei 68°C gewaschen. Als Grössenmarker (Bahn M, in Basenpaaren) wurde radioaktiv markierte, mit HindIII gesplattene λ -DNA aufgetragen.

Aminosäuresequenz von γ IP-10 wurde von der pIFN γ -31 cDNA Sequenz abgeleitet. Luster et al. (1985) isolierten die cDNA aus Interferon- γ stimulierten U937 Zellen. Interferon- γ induzierte U937 Zellen exprimieren das pIFN γ -31 entsprechende Gen mindestens dreissigmal stärker als uninduzierte Zellen. Die U937 Zelle ist eine menschliche Zelllinie mit Monozyten-ähnlichen Eigenschaften (Sundstrom & Nilsson, 1976; Koren et al., 1979).

E. Expression von 3-10C und pIFN γ -31 spezifischer RNA in induzierten U937 Zellen

U937 Zellen wurden bei einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen /ml mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem Interferon- γ oder mit $0.1 \mu\text{g/ml}$ Staphylokokkus Enterotoxin A während fünf Stunden induziert und anschliessend die RNA isoliert. Je $10 \mu\text{g}$ totale RNA wurden auf einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter transferiert (Maniatis et al., 1982). Als radioaktive Hybridisationsprobe diente der nick-translatierte 3-10C oder pIFN γ -31.7 (Luster et al., 1985) cDNA Insert (siehe Fig. 18). Staphylokokkus Enterotoxin A induziert in diesen Monozyten-ähnlichen U937 Zellen nur das 3-10C Gen und Interferon- γ nur das pIFN γ -31 entsprechende Gen. Die Induktion ist in beiden Fällen mindestens dreissigfach.



Figur 18. Nachweis von 1-3E und pIFN γ -31 spezifischer RNA in induzierten und uninduzierten U937 Zellen. U937 Zellen (5×10^5 Zellen/ml) wurden mit 10, 100 und 1000 Einheiten Interferon- γ pro ml (Bahn 2,3,4) oder mit 0.1 μ g/ml Staphylokokkus Enterotoxin A (Bahn 5) während 5 Stunden induziert, anschließend die RNA isoliert (Auffray & Rougeon, 1980), je 10 μ g auf einem Agarosegel (Maniatis et al., 1982) aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter transferiert. Als Kontrolle wurden ebenfalls 10 μ g RNA aus uninduzierten Zellen (Bahn 1) analysiert. Zuerst wurde das nick-translatierte 5'BamHI-BamHI Fragment des 3-10C cDNA Inserts (5×10^5 cpm/ml) als Hybridisierungsprobe (B) verwendet. Die Hybridisierung erfolgte in 50 % Formamid, 5x SSC, 20 mM PIPES (pH 6.5), 0.5 % SDS, 2x Denhardt's Lösung, 0.2 mg/ml Träger DNA bei 42°C während 16 Stunden, das Waschen in 0.3x SSC, 0.5 % SDS bei 60°C. Nach erfolgter Autoradiographie wurde die Probe abgewaschen (2 mal 3 Minuten in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) bei 100°C) und der nick-translatierte PstI Insert der pIFN γ -31.7 cDNA (Luster et al., 1985) als Probe (A) verwendet. Als Grössenmarker (M in Nukleotiden) dienten radioaktiv markierte SP6 RNAs mit bekannten Molekulargewichten.

3.3.2. Diskussion

Das von der 3-10C cDNA kodierte Protein zeigt markante Ähnlichkeit zu β -Thromboglobulin, Platelet Factor 4 und γ IP-10 (siehe Fig. 17). Alle 4 Proteine haben an homologen Stellen Cysteinreste. Von β -Thromboglobulin ist bekannt, dass Cys 16 mit Cys 61 und Cys 36 mit Cys 78 (Numerierung wie in Fig. 17) Disulfidbrücken bildet (Begg et al., 1978).

Platelet Factor 4 besitzt eine Heparin-neutralisierende Aktivität (Conley et al., 1948) und wird, gebunden an Chondroitin 4-Sulfat Proteoglykan Trägerproteine (Barber et al., 1972), in den α Granulen der Blutplättchen gespeichert (Broekman et al., 1975). Nach Deuel et al. (1977) könnte die Carboxy-terminale Region von Platelet Factor 4 mit den positiv geladenen und hydrophoben Seitenketten (Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu, Position 87-94) für die stöchiometrische Bindung von Heparin (Barber et al., 1972) verantwortlich sein. Platelet Factor 4 wird während der Aggregation der Blutplättchen ausgeschieden, die durch Kollagen, Thrombin, Adenosindiphosphat (Niewiarowski & Thomas, 1969) oder Epinephrin (Youssef & Barkhan, 1968) ausgelöst werden kann. Platelet Factor 4 ist ein chemotaktisches Agens für Monozyten, neutrophile Granulozyten und Fibroblasten (Deuel et al., 1981; Senior et al., 1983). Eine weitere Eigenschaft dieses Faktors ist die Hemmung der Kollagenase aus menschlichen Hautzellen und menschlichen Granulozyten (Hiti-Harper et al., 1978). Die physiologische Bedeutung von Platelet Factor 4 ist unbekannt.

β -Thromboglobulin wird, wie Platelet Factor 4, nach einer Induktion durch Thrombin von den Blutplättchen ausgeschieden (Moor et al., 1975). Beide Faktoren gehören zu den wenigen Proteinen, die von den Megakaryozyten selbst synthetisiert werden (Moor et al., 1975; Broekman et al., 1975; Niewiarowski et al., 1976). Obwohl β -Thromboglobulin eine ähnliche Sequenz am Carboxy-terminalen Ende beinhaltet wie Platelet Factor 4 (siehe Fig. 17), weist es keine Affinität zu Heparin (Begg et al., 1978) auf. Begg et al. (1978) vermuten deshalb, dass die Kapazität, Heparin zu binden, eher auf die dreidimensionale Struktur als auf eine einfache Interaktion von Ladungen zurückzuführen ist. β -Thromboglobulin ist ein chemotaktisch aktiver Faktor für Fibroblasten (Senior et al., 1983) und hemmt die Produktion von Prostacyclin (PGI_2) in Endothelzellen (Hope et al., 1979). PGI_2 verhindert das Haften von Blutplättchen an die innere Wand von Blutgefäßen und die Aggregation von Blutplättchen (Moncada et al., 1976). Die physiologische Funktion von β -Thromboglobulin ist ebenfalls unbekannt.

Low-affinity Platelet Factor 4 (Rucinski et al., 1979) ist ein weiteres Protein, das von Blutplättchen ausgeschieden wird. Wie Arbeiten von Holt und Niewiarowski (1980) und Castor et al., (1983) zeigten, ist die Aminosäuresequenz von diesem Faktor und β -Thromboglobulin dieselbe, ausser dass Low-affinity Platelet Factor 4 am Amino-terminalen Ende vier Aminosäuren (Asn-Leu-Ala-Lys-) mehr hat. Möglicherweise ist β -Thromboglobulin ein Abbauprodukt von Low-affinity Platelet Factor 4, das immer noch einige biologische Aktivitäten besitzt.

Vom Protein γ IP-10, für das die IFN γ -31 cDNA Sequenz (Luster et al., 1985) kodiert, ist keine biologische Aktivität bekannt. Auf Grund der Struktur nehmen Luster et al. (1985) an, dass das Protein γ IP-10 von den Zellen ausgeschieden wird.

Ebenfalls unbekannt ist die Funktion des hier beschriebenen Faktors, dessen Sequenz von der 3-10C cDNA abgeleitet wurde. Sehr wahrscheinlich wird auch dieses Protein, wie diejenigen, zu denen es eine Homologie zeigt, ausgeschieden. Die unterschiedliche Induzierbarkeit des pIFN γ -31 Gens und des 3-10C Gens in U937 Zellen ist bemerkenswert (siehe Fig. 18), aber noch nicht interpretierbar.

Alle aufgezählten Eigenschaften von Platelet Factor 4 und β -Thromboglobulin weisen darauf hin, dass diese Proteine und sehr wahrscheinlich auch die beiden strukturell verwandten Faktoren γ IP-10 und 3-10C bei Entzündungen und Heilungsprozessen von Wunden wichtig sind.

Um die biologische Aktivität und die Funktion des 3-10C Proteins analysieren zu können, wäre es notwendig, das Protein rein zu haben. Eine Isolation aus induzierten U937 Zellen mit Antikörpern gegen das Protein sollte möglich sein, weshalb bisher erfolglos versucht wurde, solche Antikörper herzustellen (siehe Material und Methoden Abschnitt 11.B.). Die Kenntnisse über die Blutzellen, die das 3-10C Protein und den Faktor γ IP-10 produzieren wären ebenfalls wichtig. Im Zusammenhang mit der verschiedenen Induzierbarkeit des 3-10C

und des pIFN γ -31 Gens sollten auch noch weitere Zelllinien untersucht werden. In diese Untersuchungen sollten auch Platelet Factor 4 und β -Thromboglobulin eingeschlossen werden.

4. MATERIAL UND METHODEN

1. Induktionsprotokolle

Menschliche periphere Leukozyten wurden aus Blut von normalen Spendern nach Cantell et al. (1981) isoliert und während 24 oder 48 Stunden mit $0.1 \mu\text{g/ml}$ Staphylokokkus Enterotoxin A (Serva) induziert (Cantell et al., in press). Die Isolation und Induktion der Leukozyten wurde freundlicherweise von Dr. K. Cantell und seinen Mitarbeitern ausgeführt.

Die U937 Zellen (Sundstrom & Nilsson, 1976) wurden einen Tag vor der Induktion in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen in frischem RPMI-1640 Medium (Gibco) mit 10 % fötalem Kälberserum (Gibco) ausgesät. Rekombinantes Interferon- γ (2.9×10^7 Einheiten/mg, Reinheit: mind. 98 %, Pyrogengehalt: 0.2 ng/ml) wurde freundlicherweise von Dr. M. Fountoulakis zur Verfügung gestellt.

2. Methoden zur Isolation der RNA

Leukozyten RNA wurde nach Nagata et al. (1980a) isoliert. Die Zellen wurden in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 2 % SDS (Natrium Laurylsulfat) lysiert, das Lysat mit 0.2 mg/ml Pronase (Calbiochem) verdaut, mit Phenol extrahiert und anschliessend die Nukleinsäuren mit Aethanol gefällt. Das Präzipitat wurde in 1x TNE (1x TNE : 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA) gelöst, zweimal mit Phenol, einmal mit Chloroform und mehrmals mit Aether extrahiert und die

Poly(A)⁺-RNA mittels Oligo(dT)-Cellulose Chromatographie (Collaborative Research) aufgearbeitet (Aviv & Leder, 1972). Die Auftrennung auf einem Saccharosegradienten (5 - 23 % Saccharose gelöst in 0.2 M NaCl, 15 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA) erfolgte in einem SW41 Rotor bei 35'000 rpm und 10°C während 16 Stunden. Die RNA wurde vor dem Auftragen auf den Gradienten in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA während 60 Sekunden bei 100°C inkubiert und sofort auf 0°C abgekühlt. Radioaktiv markierte DNA Fragmente dienten, auf einem separaten Gradienten aufgetragen, als Grössenmarker.

Die RNA aus den U937 Zellen wurde mit der LiCl-Harnstoff-Methode isoliert (Auffray & Rougeon, 1980).

3. Herstellen der cDNA Banken

A. cDNA Synthese mit Oligo(dT) als Primer

Die cDNA wurde nach Standardprotokollen (Villa-Komaroff et al., 1978; Nagata et al., 1980a) synthetisiert und in die PstI Stelle von pBR322 (Bolivar et al., 1977) eingeführt. 1 µg Poly(A)⁺-RNA aus Staphylokokkus Enterotoxin A induzierten Leukozyten, mit einer Grösse von 1000 bis 2000 Nukleotiden, wurde in 25 µl Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 0,4 mM Dithiothreitol (DTT), 30 µg/ml Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (P & L Biochemicals), 0.1 mg/ml Actinomycin D (Sigma), 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM dTTP) mit 5 Einheiten Retrotranskriptase (Geschenk von Life Science, Inc.) während 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von EDTA (Endkonzentration 10 mM) und SDS (Endkonzentration 0,2 %) wurde der Ansatz

zweimal mit Phenol, einmal mit Chloroform extrahiert. Die Nukleinsäuren wurden mittels Sephadex G-50 Säule (Pharmacia) gereinigt und mit Aethanol gefällt. Das Präzipitat wurde in 45 μ l H₂O gelöst und nach Zugabe von 5 μ l 5M NaOH 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Hydrolyse der RNA wurde das pH mit 5 M Essigsäure auf 6 eingestellt und die einzelsträngige cDNA mit Aethanol gefällt. Für die Synthese des zweiten Strangs wurde die cDNA in 25 μ l H₂O gelöst, 2 Minuten bei 90°C inkubiert, anschliessend rasch auf Eis gestellt und 5 μ l Puffer (100 mM Kaliumphosphat (pH 6.9), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, 2 mM dCTP) zugegeben. Nach Zugabe von 24 Einheiten DNA Polymerase I (Endkonzentration 4800 Einheiten/ml, Biolabs), wurde der Ansatz während 6 Stunden bei 15°C inkubiert. Daraufhin wurde 1/10 Volumen 10x TNE zum Reaktionsgemisch gegeben, einmal mit Phenol : Chloroform (1 : 1) extrahiert und die wässrige Phase auf einer Sephadex G-50 Säule aufgetrennt, die Fraktionen mit der cDNA gepoolt und mit Aethanol gefällt. Um die Reaktionen zu verfolgen, wurde den Ansätzen sowohl für die Erst- wie Zweitstrang-Synthese der cDNA (α -³²P)-dCTP (5×10^{11} bzw. 2×10^{12} cpm/mMol dCTP) beigemischt. Danach wurde die doppelsträngige cDNA in 50 μ l 250 mM NaCl, 30 mM NaAcetat (pH 4.5), 5 mM ZnSO₄ 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert und nach Zugabe von 5 Einheiten S₁-Nuklease (P & L Biochemicals) 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von EDTA (Endkonzentration 10 mM) und SDS (Endkonzentration 0.2 %) und einer Extraktion mit Phenol : Chloroform (1 : 1), wurde die DNA mit Aethanol gefällt. Auf einem "low melting temperature" Agarosegel (LMT; Sea Plaque Agarose, FMC Corp.) wurde die cDNA

aufgetrennt und die DNA mit einer Grösse von 400 bis 1300 Basenpaaren aus dem Gel eluiert (Weislander, 1979). Die Elongation der 5'-Enden der cDNA mit dCTP und Terminaler Transferase (Präparat von W. Boll, 6×10^3 Einheiten/ml) wurde in 200 mM Tris-Cacodylat (pH 7.6), 1 mM CoCl_2 , 0.1 mM DTT, 0.1 mM dCTP ausgeführt. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert, auf Eis gestellt, Terminale Transferase (3 Einheiten/10 μl Reaktionsvolumen) zugegeben und 3 Minuten bei 27°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 1x TNE gestoppt. Die Hybridisierung der dC-elongierten cDNA an dG-elongierte PstI-gespaltene pBR322 DNA erfolgte in 1x TNE je 1 Stunde bei 65°C, 46°C, 37°C und 22°C. Anschliessend wurde der Ansatz direkt verwendet um E.coli SK1592 Zellen zu transfektieren (Cohen et al., 1972).

B. cDNA Synthese nach der Okayama-Berg Methode

Als Matrize diente wiederum Poly(A)⁺-RNA aus Staphylokokkus Enterotoxin A induzierten Leukozyten, die auf einem Saccharosegradienten in vier Fraktionen aufgetrennt worden war, nämlich RNA von grösser 3000, 2200 - 3000, 1300 - 2200 und 800 - 1300 Nukleotiden Länge. Von allen vier Präparaten wurden unabhängige cDNA Banken gemäss den Vorschriften von Okayama und Berg (1982) und Staeheli et al. (1986) hergestellt. Die dT-respektiv dG-elongierten Fragmente des Vektors pHG327 wurden freundlicherweise von W. Boll zur Verfügung gestellt. Nach der Transfektion der cDNA in E.coli DH1 (Hanahan, 1983) wurden die Ampicillin resistenten Klone nicht ausplattiert, wie in der Arbeit von Staeheli et al. (1986), sondern direkt in Medium aufgezüchtet, die Plasmid DNA isoliert und auf einem "low

melting temperature" Agarosegel aufgetrennt. Plasmide mit cDNA Inserts von der Grösse der ihr zugrunde liegender Poly(A)⁺-RNA wurden aus dem Gel eluiert und in E.coli HB101 transfektiert. Aus diesen Kolonien wurden durch Filterhybridisierung diejenigen isoliert, die mit den spezifischen Proben hybridisierten.

4. Kolonienhybridisierungen

Die Filter für die Plus-Minus-Hybridisierung wurden nach der Methode von Grunstein und Hogness (1975) zubereitet. Die Filterhybridisierung wurde nach Hanahan und Meselson (1980) vorgenommen. Als radioaktive Hybridisationsproben dienten einzelsträngige cDNAs, die wie unter 3.A. beschrieben, synthetisiert wurde, ausser dass die Konzentration zweier Nukleosidtriphosphate (dATP, dCTP) nur 2.5 μ M war. Dafür enthielt der Ansatz (10 μ l) je 40 μ Ci (α -³²P) dATP und (α -³²P) dCTP (410 Ci/mMol, 10 mCi/ml, Amersham). Die Ausbeute war rund 4×10^7 cpm/ μ g RNA. Sowohl Vorhybridisierung wie Hybridisierung wurden während 16 Stunden bei 68°C ausgeführt in 4x SET (1x SET : 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl (pH 8.0)), 0,2 % SDS, 5x Denhardt's Lösung (1x : 0.02 % Rinder Serum Albumin (Fraktion 5, Sigma), 0.02 % Polyvinyl Pyrrolidon, 0.02 % Ficoll; Denhardt, 1966), 0,2 mg/ml Alkali-denaturierte Salmsperma DNA (Type III, Sigma, abgekürzt Träger DNA), 10 μ g/ml Poly(A) (Boehringer) mit 10^6 cpm/ml radioaktiver Probe. Gewaschen wurden die Filter dreimal kurz in 2x SET, 0,2 % SDS bei Raumtemperatur (RT), dreimal 1 Stunde im selben Puffer bei 68°C und dreimal 30 Minuten in 3 mM Tris (Base) bei Raumtempe-

ratur. Für die Autoradiographie bei -70°C wurden Fuji RX Filme und Wolframmat-Verstärkerfolien (Ilford) verwendet.

Für die Identifikation der 1-3E, 3-10C, 4-10E und 6-12H entsprechenden Klone in der cDNA Bank mit dem Vektor pHG327, wurden die Filter für die Kolonienhybridisierung nach Taub und Thomson (1982) aufgearbeitet. Die Vorhybridisierung erfolgte in 5x SET, 5x Denhardt's Lösung, 0.2 % SDS, 0.2 mg/ml Träger DNA bei 68°C während 4 Stunden. Für die Hybridisierung bei 68°C während 16 Stunden in 5x SET, 1x Denhardt's Lösung, 0.2 % SDS, 0.2 mg/ml Träger DNA dienten die nick-translatierten (Rigby et al., 1977) cDNA Inserts (10^8 cpm/ μg) als radioaktive Proben, wobei rund 2×10^5 cpm/ml Hybridisierungspuffer eingesetzt wurden. Gewaschen wurden die Filter zweimal kurz in 2x SSC (1x SSC: 150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat (pH 6.5)), 0.2 % SDS bei Raumtemperatur, dreimal 30 Minuten in 2x SSC, 0.2 % SDS bei 68°C und viermal 30 Minuten in 0.2x SSC, 0.2 % SDS bei 68°C .

5. Sequenzierungsmethoden

A. Methode nach Maxam und Gilbert

Zwei verschiedene Strategien wurden angewandt. Entweder wurde zuerst eine Restriktionskarte erstellt (Smith & Birnstiel, 1976) und dann von passenden Restriktionsstellen aus sequenziert, oder es wurden einseitig Deletionen ins Plasmid eingeführt (Frischauf et al., 1980) und anschliessend von den Endpunkten der Deletionen aus sequenziert. Bei 5'-überhängenden Restriktionsstellen wurden beide Stränge markiert. Die

dephosphorylierten 5'-Enden wurde mit Polynukleotidkinase (Biolabs) und (γ - ^{32}P)ATP (nach einem Protokoll von Dr. I.T. Kennedy hergestellt) phosphoryliert; 3'-Enden wurden mit Klenow Polymerase (Biolabs) und den erforderlichen (α - ^{32}P)-dNTPs aufgefüllt. Die Abbaureaktionen und die Gelelektrophorese wurde nach Maxam und Gilbert (1980) durchgeführt. Die Verwendung von langen Gelen (1 m lang, 0.3 mm dick) ermöglichte das Ablesen bis zu 550 Nukleotiden von einem markierten Ende aus.

B. Methode nach Sanger

Für die Sequenzbestimmung mit der Dideoxy-Methode (Sanger et al., 1977) wurde der isolierte cDNA Insert mit einem der drei Restriktionsenzyme AluI, RsaI oder Sau3A gespalten und das Fragmentgemisch in den Polylinker (die AluI und RsaI Fragmente in die SmaI Stelle, die Sau3A Fragmente in die BamHI Stelle) von M13 mp9 (Messing & Vieira, 1982) eingesetzt und in E.coli JM103 (Messing, 1979) kloniert. Phagen DNA wurde nach Messing und Vieira (1982) aufgearbeitet. Die Sequenzreaktionen wurden nach Sanger et al. (1980), die Gelelektrophorese nach Messing (1983) ausgeführt.

6. Southern Analysen

Menschliche Leukozyten DNA (von Dr. S. Nagata zur Verfügung gestellt) wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen vollständig gespalten und auf einem 0.8 % Agarosegel (40 mM Tris, 1 mM EDTA, mit Essigsäure auf pH 7.8 eingestellt), 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid) aufgetrennt. Anschliessend wurde das Gel 2

Minuten unter eine UV-Lampe (254 nm, 30W, Abstand 30 cm) gelegt, 60 Minuten in 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl und 60 Minuten in 1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1.5 M NaCl inkubiert. Nach Ueberführung der DNA (Southern, 1975) auf einen Nitrozellulosefilter (Sartorius, 0.1 μ m) mit 10x SSC wurde der Filter kurz in 6x SSC gewaschen, getrocknet und 2 Stunden bei 80°C in einem Vakuumofen gebacken. Vorhybridisiert wurden die Filter in 5x SET, 0.2 % SDS, 5x Denhardt's Lösung, 0.2 mg/ml Träger DNA. Als radioaktive Hybridisationsproben dienten die nick-translatierten cDNA Inserts, die in einer Konzentration von 3×10^6 cpm/ml Puffer (5x SET, 0.2 % SDS, 1x Denhardt's Lösung, 0.2 mg/ml Träger DNA) eingesetzt wurden. Vorhybridisierung wie Hybridisierung erfolgten bei 68°C während 16 Stunden. Gewaschen wurden die Filter zweimal kurz in 2x SSC, 0.2 % SDS bei Raumtemperatur, zweimal 30 Minuten im selben Puffer bei 68°C und zweimal 30 Minuten in 0.2x SSC, 0.2 % SDS bei 68°C.

Für die Analyse der cDNA Klone, die spezifisch für induzierte Gene waren (siehe Abschnitt 3.1.), wurde ein leicht modifiziertes Protokoll verwendet. Das Gel wurde nicht mit UV-Licht bestrahlt, sondern 15 Minuten in 0.25 M HCl getränkt. Die nächsten Schritte waren dann gleich wie im oben erwähnten Protokoll. Die Vorhybridisierung und Hybridisierung der Filter in 4x SET, 0.2 % SDS, 5x Denhardt's Lösung, 0.2 mg/ml Träger DNA, 10 μ g/ml Poly(A) erfolgte bei 68°C. Als Probe (2×10^6 cpm/ml) diente wie für die Plus-Minus-Hybridisierung radioaktiv markierte einzelsträngige cDNA. Die anschliessenden Waschschrte waren dieselben wie bei der Kolonienhybridisierung (dreimal kurz in 2x SET, 0.2 % SDS bei Raumtemperatur,

dreimal 60 Minuten im selben Puffer bei 68°C, dreimal 30 Minuten in 3 mM Tris(Base) bei Raumtemperatur).

7. Northern Analysen

Die RNA (5–10 µg) wurde auf einem Agarosegel (1.2 % Agarose, 40 mM MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure), 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA (pH 7.0), 2.2 M Formaldehyd; 1 cm breite, 1 mm tiefe Schlitze) aufgetrennt (Maniatis et al., 1982). Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel sukzessive je 20 Minuten in 50 mM NaOH, 10 mM NaCl, in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) und in 20x SSC gebadet. Nach dem Transfer mit 20x SSC bei Raumtemperatur auf einen Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schüll, 0.45 µm) wurde der Filter in 3x SSC gewaschen, getrocknet und 2 Stunden im Vakuumofen bei 80°C gebacken. Der Puffer für die Vorhybridisierung und Hybridisierung, die bei 42°C erfolgten, war 50 % Formamid (dreimal umkristallisiert), 5x SSC, 20 mM PIPES (pH 6.5), 0,5 % SDS, 2x Denhardt's Lösung, 0.2 mg/ml Träger DNA. Als Hybridisationsproben dienten die nick-translatierten cDNA Inserts, wobei rund 5×10^5 cpm/ml Puffer eingesetzt wurden. Gewaschen wurden die Filter dreimal kurz in 0.3x SSC, 0.5 % SDS bei Raumtemperatur, zweimal 30 Minuten im selben Puffer bei 60°C und einmal kurz in 0.3x SSC bei Raumtemperatur. Die Filter wurden nass auf eine Glasplatte gelegt, mit Saranfolie abgedeckt und ein Film (Fuji RX) aufgelegt. Die Autoradiographie erfolgte bei -70°C mit Wolframat-Verstärkerfolie (Ilford). Solange die Filter feucht blieben, konnten sie mehrmals verwendet werden. Die Hybridisierungsproben konnten durch Waschen (zweimal 3 Minuten) in

kochendem 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) entfernt werden.

8. Dot Blots

Die RNA wurde im 20 mM Methylquecksilberhydroxyd, Natriumborat Puffer (50 mM Borsäure, 5 mM Natriumborat, 10 mM Natriumsulfat, 1 mM EDTA) während 10 Minuten bei 50°C denaturiert (Bailey & Davidson, 1976), je 0.5 µg RNA auf einen Nitrozellulosefilter (Sartorius) aufgetupft und der Filter bei 80°C 2 Stunden in einem Vakuumofen gebacken. Der Vorhybridisierungspuffer war 50 % Formamid, 5x SSC, 50 mM Natriumphosphat (pH 6.4), 0.1 % SDS, 5x Denhardt's Lösung, 0.2 mg/ml Träger DNA. Vorhybridisierung und Hybridisierung (in 50 % Formamid, 5x SSC, 50 mM Natriumphosphat (pH 6.4), 0.1 % SDS, 1x Denhardt's Lösung, 0.2 mg/ml Träger DNA, 50 µg/ml Träger RNA) wurden bei 42°C ausgeführt. Als markierte Proben dienten die nick-translatierten cDNA Inserts in einer Konzentration von 10^5 cpm/ml Puffer. Das Waschen der Filter erfolgte dreimal kurz in 2x SSC, 0.1 % SDS bei Raumtemperatur und dreimal 30 Minuten in 0.3x SSC, 0.1 % SDS bei 60°C.

9. Sequenzvergleiche

Die Vergleiche mit in Datenbanken gespeicherten Sequenzen wurde von W. Stubblebine mit einem Programm, das nach dem Verfahren von Lipman und Pearson (1985) ³arbeitete, vorgenommen.

10. Hydrophobizitätskurven

Die Hydrophobizität wurde nach den Werten von von Heijne (1981) ermittelt, wobei immer der Mittelwert von sieben aufeinanderfolgenden Aminosäuren aufgezeichnet wurde. Das Programm wurde von Dr. R. Bürgi zur Verfügung gestellt.

11. Gewinnung von Antiseren

A. Antiseren gegen ein β -Galaktosidase-1-3E Fusionsprotein

Indem die 1-3E cDNA (BamHI-BamHI Insert) in der einen Orientierung in die BamHI-Stelle des Plasmids pUR278 (Rüther & Müller-Hill, 1983) eingesetzt wurde, konnte in E.coli RR1 Δ M15 (Rüther, 1982) ein β -Galaktosidase-(1-3E) Fusionsprotein exprimiert werden. Die Isolierung des Fusionsproteins aus den Bakterien, die in 2x TY Medium (Maniatis et al., 1982), 0.5 mM Isopropyl- β -D-thio-galaktopyranosid (Serva), 0.1 mg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C unter Schütteln aufgezüchtet wurden, erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden. Im einen Fall wurden die Bakterien abzentrifugiert, in einem Lysepuffer (50 mM Hepes-NaOH (pH 7.0), 30 mM NaCl, 1 % SDS, 1 % Mercaptoaethanol, 5M Harnstoff; Derynck et al., 1980) resuspendiert und 2 Minuten bei 100°C inkubiert. Das Zellysat wurde direkt auf einem 10 %-igen präparativen SDS-Polyacrylamidgel (Lämmli, 1970) aufgetrennt und anschliessend die Gelbande des Fusionsproteins ausgeschnitten. Lokalisiert wurde das Fusionsprotein, indem ein Teil des Gels mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt wurde (Weber et al., 1972). Das Fusionsprotein wurde samt dem Polyacrylamid intramuskulär in

zwei Kaninchen gespritzt, wobei pro Oberschenkel etwa 0.2 mg Fusionsprotein in 0.5 g Polyacrylamid injiziert wurde. In einem zweiten Verfahren wurde das Fusionsprotein oder die β -Galaktosidase (als Kontrolle) nach Valenzuela et al. (1985) aufgearbeitet, wobei in Abweichung von diesem Protokoll das Pellet zuerst mit 6 M Harnstoff, 0.2 mM DTT, 10 mM Benzamidin, 1x PBS (1x PBS : 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) gewaschen wurde und erst die Fraktion, die sich in 8 M Harnstoff, 0.2 mM DTT, 10 mM Benzamidin, 1x PBS löste, wurde für die Immunisierung verwendet. Die Proteine wurden noch mit 5 Volumen Aceton gefällt und in 0.1 % SDS wieder gelöst (Endkonzentration 3.5 mg/ml). Bei jeder Immunisierung wurde den Kaninchen 0.5 ml dieser Lösung (enthielt etwa 5 % Fusionsprotein oder β -Galaktosidase) in jeden Oberschenkel injiziert. Bei den ersten drei Immunisierungen der Kaninchen, die in Abständen von zwei Wochen erfolgten, wurde komplettes Freund's Adjuvans (1 : 1 v/v, DIFCO), bei der letzten inkomplettes Adjuvans verwendet. Drei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere ausgeblutet. Mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay; Voller et al., 1978) konnte festgestellt werden, dass alle Seren Antikörper gegen β -Galaktosidase enthielten. Antikörper gegen die 1-3E Sequenz konnten noch nicht nachgewiesen werden.

B. Antiseren gegen Peptide

Drei Peptide mit Sequenzen, die hydrophilen^a Regionen des 3-10C Proteins entsprechen (Aminosäuren 25-39, 67-79 und 81-96; siehe Fig. 13 und Fig. 14) wurden freundlicherweise von Dr. J. Leban synthetisiert. Die Peptide wurden einzeln nach Richard-

son et al. (1985) mit Glutaraldehyd oder 1-Aethyl-3-(3-dimethylamoniopropyl) carbodiimid als Kopplungsreagenzien an ein Trägerprotein (Keyhole Limpet Hemocyanin; SIGMA) gebunden. Sechs Kaninchen wurden mit je einem dieser Präparate immunisiert. Die ersten beiden Immunisierungen erfolgten intramuskulär mit je 1 ml Präparat (2mg/ml) und komplettem Freund's Adjuvans (1 : 1 v/v; DIFCO) im Abstand von zwei Wochen. Die dritte und vierte Immunisierung erfolgten mit inkomplettem Freund's Adjuvans, wobei bei der vierten Immunisierung zusätzlich noch 2 mg Peptid (in 1 ml 1x PBS gelöst) intravenös verabreicht wurde. Bei der fünften und sechsten Immunisierung wurden ebenfalls 2 mg Peptid (in 1 ml 1x PBS) intravenös gespritzt. Drei Wochen nach der letzten Immunisierung, die etwa alle zwei Wochen vorgenommen wurden, wurden die Tiere ausgeblutet. Mittels ELISA konnte bis jetzt nur gezeigt werden, dass die Seren Antikörper gegen die Peptide enthalten, ob sie auch an das 3-10C Protein binden, muss noch abgeklärt werden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Abramson, S., Miller, R.G. & Phillips, R.A. (1977).
J. Exp. Med. 145, 1567 - 1579
- Auffray, C. & Rougeon, F. (1980). Eur. J. Biochem. 107,
303 - 314
- Auron, P.E., Webb, A.C., Rosenwasser, L.J., Mucci, S.F.,
Rich, A., Wolff, S.M. & Dinarello, C.A. (1984). Proc.
Nat. Acad. Sci., U.S.A. 81, 7907 - 7911
- Aviv, H. & Leder, P. (1972). Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.
69, 1408 - 1412
- Bailey, J.M. & Davidson, N. (1976). Anal. Biochem.
70, 75 - 85
- Barber, A.J., Käser-Glanzmann, R., Jakabova, M. & Lüscher,
E.F. (1972). Biochim. Biophys. Acta 286, 312 - 329
- Bazill, C.W., Haynes, M., Garland, J. & Dexter, T.M. (1983).
Biochem. J. 210, 747 - 759
- Becker, A.J., McCulloch, E.A. & Till, J.E. (1963). Nature
(London) 197, 452 - 454
- Begg, G.S., Pepper, D.S., Chesterman, C.N. & Morgan F.J.
(1978). Biochemistry 17, 1739 - 1744
- Bell, G.I., Quinto, C., Quiroga, M., Valenzuela, P.,
Craik, C.S. & Rutter, W.J. (1984). J. Biol. Chem.
259, 14265 - 14270
- Blobel, G. (1975). J. Cell Biol. 67, 835 - 851
- Blobel, G. (1979). Symp. Soc. Exp. Biol. 33, 9 - 39
- Bolivar, F., Rodriquez, R.L., Green, P.J., Betlach, M.C.,
Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Croso, J.H. & Falkow, S.
(1977). Gene 12, 95 - 113

- Bradley, T.R. & Metcalf, D. (1966). Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44, 287 - 300
- Broekman, J.M., Handin, R.I. & Cohen, P. (1975). Br. J. Haematol. 31, 51 - 55
- Cantell, K., Hirvonen, S., Kauppinen, H.-L. & Myllylä, G. (1981). Methods in Enzymology 78, 29 - 38
- Cantell K., Hirvonen, S. & Kauppinen, H.-L. Methods in Enzymology (in press)
- Castor, C.W., Miller, J.W. & Walz, D.A. (1983). Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 80, 765 - 769
- Chen, B.M. & DiSabato, G. (1967). Cell. Immun. 22, 211 - 224
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. (1972). Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 69, 2110 - 2114
- Conley, C.L., Hartmann, R.C. & Lalley, J.S. (1948). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 69, 284 - 286
- Craik, C.S., Choo, Q.-L., Swift, G.H., Quinto, C., MacDonald, R.J. & Rutter, W.J. (1984). J. Biol. Chem. 259, 14255 - 14264
- Curry, J.L. & Trentin, J.J. (1967). Develop. Biol. 15, 395 - 413
- Dayhoff, M.O. (1976). In: Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, Suppl. 2
- Dayhoff, M.O. (1978). In: Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, Suppl. 3
- Degrave, W., Tavernier, J., Duerinck, F., Plaetinck, G., Devos, R. & Fiers, W. (1983). EMBO J. 2, 2349 - 2353
- Denhardt, D. (1966). Biochem. Biophys. Res. Comm. 23, 641 - 646
- Dennert, G. (1980). Nature (London) 287, 47 - 49

- Derynck, R., Remaut, E., Stanssens, P., DeClercq, E.,
Content, J. & Fiers, W. (1980). *Nature* (London) 287,
193 - 197
- Deuel, T.F., Keim, P.S., Farmer, M. & Heinrikson, R.L. (1977).
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 74, 2256 - 2258
- Deuel, T.F., Senior, R.M., Chang, D., Griffin, G.L., Heinrik-
son, R.L. & Kaiser, E.T. (1981). *Proc. Nat. Acad.*
Sci., U.S.A. 78, 4584 - 4587
- Dick, J.E., Magli, M.C., Huszar, D., Phillips, R.A. &
Bernstein, A. (1985). *Cell* 42, 71 - 79
- Dy, M., Lebel B., Kamoun, P. & Hamburger, J. (1981). *J.*
exp. Med. 153, 293 - 309
- Frischauf, A.M., Garoff, H. & Lehrach, H. (1980). *Nucl.*
Acids Res. 8, 5541 - 5549
- Fung, M.C., Hapel, A.J., Ymer, S., Cohen, D.R., Johnson,
R.M., Campbell, H.D., & Young, I.G. (1984). *Nature*
(London) 307, 233 - 237
- Gasson, J.C., Golde, D.W., Kaufman, S.E., Westbrook, C.A.,
Hewick, R.M., Kaufman, R.J., Wong, G.G., Temple, P.A.,
Leary, A.C., Brown, E.L., Orr, E.C. & Clark, S.C.
(1985). *Nature* (London) 315, 768 - 771
- Gough, N.M., Gough, J., Metcalf, D., Kelso, A., Grail, D.,
Nicola, N.A., Burgess, A.W. & Dunn, A.R. (1984). *Nature*
(London) 309, 763 - 767
- Gray, P.W., Leung, D.W., Pennica, D., Yelverton, E., Naja-
rian, R., Simonsen, C.C., Derynck, R., Sherwood, P.J.,
Wallace, D.M., Berger, S.L., Levinson, A.D. & Goed-
del, D.V. (1982). *Nature* (London) 295, 503 - 508

- Gray, P.W. & Goeddel, D.V. (1982). *Nature* (London) 298, 859 - 863
- Greenberger, J.S., Humphries, K., Messner, H., Reid, D.M. & Sakakeeny, M.A. (1985). *Exp. Hematol.* 13, 249 - 260
- Grunstein, M. & Hogness, D.S. (1975). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 70, 2330 - 2334
- Hanahan, D. & Meselson, M. (1980). *Gene* 10, 63 - 67
- Hanahan, D. (1983). *J. Mol. Biol.* 166, 557 - 580
- Harper, J.W., Cook, R.R., Roberts, J., McLaughlin, B.J. & Powers, J.C. (1984). *Biochemistry* 23, 2995 - 3002
- Harpold, M.M., Dobner, P.R., Evans R.M. & Bancroft, F.C. (1978) *Nucl. Acids Res.* 5, 2039 - 2053
- Henco, K., Brosius, J., Fujisawa, A., Fujisawa, J.-I., Haynes, J.R., Hochstadt, J., Kovacic, T., Pasek, M., Schamböck, A., Schmid, J., Todokoro, M., Wälchli, M., Nagata S. & Weissmann, C. (1985) *J. Mol. Biol.* 185, 227 - 260
- Hiscott, J., Cantell, K. & Weissmann, C. (1984a). *Nucl. Acids Res.* 12, 3727 - 3746
- Hiscott, J., Ryals, J., Dierks, P., Hoffmann, V. & Weissmann C. (1984b). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 307, 217 -226
- Hiti-Harper, J., Wohl, H. & Harper, E. (1978). *Science* 199, 991 - 992
- Hoeijmakers, J.H.J., Borst, P., van den Burg, J., Weissmann, C. & Cross, G.A.M. (1980). *Gene* 8, 391 - 417
- Holt, J.C. & Niewiarowski, S. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 632, 284 - 289
- Hope, W., Martin, T.J., Chesterman, C.N. & Morgan, F.J. (1979). *Nature* (London) 282, 210 - 212

- Houck, C., Rinehart, F. & Schmid, C. (1979). *J. Mol. Biol.* 132, 289 - 306
- Huang, K.Y., Donahoe, R.M., Gordon, F.B. & Dressler, H.R. (1971). *Infect. Immun.* 4, 581 - 588
- Ihle, N.J., Keller, J., Oroszlan, S., Henderson, L.E., Copeland, T.D., Fitch, F., Prystowsky, M.B., Goldwasser, E., Schrader, J.W., Palaszynski, E., Dy, M. & Lebel, B. (1983). *J. Immunol.* 131, 282 - 287
- Iscoe, N.N. (1978). In: *Hematopoietic Cell Differentiation*, ed. by Golde, D.W., Cline, D., Metcalf, D. & Fox, C.F. Acad. Press, pp. 37 - 52
- Iscoe, N.N., Roitsch, C.A., Williams, N. & Guilbert, L.J. (1982). *J. Cell. Physiol. Suppl.* 1, 65 - 78
- Jackson, C.M. & Nemerson, Y. (1980). *Ann. Rev. Biochem.* 49, 765 - 811
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fritsch, E.F., Kawakita, M., Shimizu, T. & Miyake, T. (1985) *Nature (London)* 313, 806 - 810
- Kampschmidt, R.F. (1984). *J. Leuk. Biol.* 36, 341 - 355
- Kawasaki, E.S., Ladner, M.B., Wang, A.M., Van Arsdrell, J., Warren, M.K., Coyne, M.Y., Schweickart, V.L., Lee, M.T., Wilson, K.J., Boosman, A., Stanley, E.R., Ralph, P. & Mark, D.F. (1985). *Science* 230, 291 - 230
- Keller, G., Paige, C., Gilboa, E. & Wagner, E.F. (1985). *Nature (London)* 318, 149 - 154

- Koren, H.S., Anderson, S.J. & Larrick, J.W. (1979). *Nature* (London) 279, 328 - 331
- Kozak, M. (1978). *Cell* 15, 1109 - 1123
- Kozak, M. (1984a). *Nucl. Acids Res.* 12, 857 - 872
- Kozak, M. (1984b). *Nature* (London) 308, 241 - 246
- Krantz, S.B., Gallfen-Lartiguc, O. & Goldwasser, E. (1963). *J. Biol. Chem.* 238, 4085 - 4090
- Lämml, U.K. (1970). *Nature* (London) 227, 680 - 685
- Lawn, R.M., Fritsch, E.E., Parker, R.C., Blake, G. & Maniatis, T. (1978). *Cell* 15, 1157 - 1174
- Lawn, R.M., Adelman, J., Franke, A.E., Houck, C.M., Gross, M., Najarian, R. & Goeddel, D.V. (1981). *Nucl. Acids Res.* 9, 1045 - 1053
- Lazure, C., Leduc, R., Seidah, N.G., Thibault, G., Genest, J. & Chrétien, M. (1984). *Nature* (London) 307, 555 - 558
- Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Gemmell, L., Larson, N., Luh, J., Arai, K. & Rennick, D. (1985). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 82, 4360 - 4364
- Lindahl, P., Leary, P. & Gresser, I. (1973). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 70, 2785 - 2788
- Lindenmann, J., Burke, D. & Isaacs, A. (1957). *Brit. J. Exp. Path.* 38, 551 - 562
- Lipman, D.J. & Pearson, W.R. (1985). *Science* 227, 1435 - 1441
- Lomedico, P.T., Gubler, U., Hellmann, C.P., Dukovich, M., Giri, J.G., Pan, Y.-C.E., Collier, K., Seminow, R., Chua, A.O. & Mizel, S.B. (1984). *Nature* (London) 312, 458 - 462

- Luster, A.D., Unkeless, J.C. & Ravetech, J.V. (1985). *Nature* (London) 315, 672 - 676
- MacDonald, R.J., Swift, G.H., Quinto, C., Swain, W., Pictet R.L., Nikovits, W. & Rutter, W.J. (1982). *Biochemistry* 21, 1453 - 1463
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Mantei, N. & Weissmann, C. (1982). *Nature* (London) 297, 128 - 132
- March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K., Conlon, P.J., Hopp, T.R. & Cosman, D. (1985). *Nature* (London) 315, 641 - 647
- Marshall, R.D. (1972). *Ann. Rev. Biochem.* 41, 673 - 702
- Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1977). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 74, 560 - 564
- Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1980). *Methods in Enzymology* 65, 499 - 560
- McCulloch, E.A., Gregory, C.J. & Till, J.E. (1973). In: *Haemopoietic Stem Cells*, ed by Wolstenholme, G.E.W. & O'Connor, M., Associated Scientific Publishers, Amsterdam, p. 183
- Mendecki, J., Lee, S.Y. & Brawerman, G. (1972). *Biochemistry* 11, 792 - 798
- Messing, J. (1979). In: *Recombinant DNA Technical Bulletin*, NIH Publication No. 79 - 99, 2, No. 2, 43 - 48
- Messing, J. & Vieira, J. (1982). *Gene* 19, 269 - 276
- Messing, J. (1983). *Methods in Enzymology* 101, 20 - 79

- Metcalf, D., Packer, J., Chester, H.M. & Kincade, P.W. (1974)
J. Cell. Physiol. 84, 275 - 290
- Metcalf, D. (1984). The Haemopoietic Cell Stimulating
Factors, Elsevier, Amsterdam
- Mintz B., Anthony, K. & Litwin, S. (1984). Proc. Nat. Acad.
Sci., U.S.A. 81, 7835 - 7839
- Miyatake, S., Otsuka, T., Yokota, T., Lee, F. & Arai, K.
(1985a) EMBO J. 4, 2561 - 2568
- Miyatake, S., Yokota, T., Lee, F. & Arai, K. (1985b). In:
Cellular and Molecular Biology of Lymphokines, ed.
by Sorg, C. & Schimpl, A., Academic Press, Inc., pp.
659 - 663
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. & Vane, J.R. (1976)
Nature (London) 263, 663 - 665
- Moore, S., Pepper, D.S. & Cash, J.D. (1975). Biochim. Bio-
phys. Acta 379, 370 - 384
- Morgan, D.A., Ruscetti, F.W. & Gallo, R. (1976). Science
193, 1007 - 1008
- Nabel, G., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F. & Cantor,
H. (1981) Nature (London) 291, 332 - 334
- Nagata, S., Taira, H., Hall, A., Johnsrud, L., Streuli,
M., Ecsödi, J., Boll, W., Cantell, K. & Weissmann,
C. (1980a). Nature (London) 284, 316 - 320
- Nagata, S., Mantei, N. & Weissmann, C. (1980b). Nature
(London) 287, 401 - 408
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., Yamazaki, T.,
Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., No-
mura, H. & Ono, M. (1986) Nature (London) 319, 415 - 418

- Neurath, H. (1984). *Science* 224, 350 - 357
- Niewiarowski, S. & Thomas, D.P. (1969) *Nature (London)* 222,
1269 - 1270
- Niewiarowski, S., Lowery, C.T., Hawiger, J., Millman, M.
& Thimmons, S. (1976). *J. Lab. Clin. Med.* 87,
720 - 733
- Noma, Y., Sideras, P., Naito, T., Bergstedt-Lindquist, S.,
Azuma, C., Severinson, E., Tanabe, T., Kinashi, T.,
Matsuda, F., Yaoita, Y. & Honjo, T. (1986). *Nature*
(London) 319, 640 - 646
- Okayama, H. & Berg P. (1982). *Mol. Cell. Biol.* 2, 161 - 170
- Pasternack, M.S. & Eisen, H.N. (1985). *Nature (London)* 314,
743 - 745
- Pauker, K., Cantell, K. & Henle, W. (1962). *Virology* 17,
324 - 334
- Pluznik, D.H. & Sachs, L. (1965). *J. Cell. Comp. Physiol.*
66, 314 - 324
- Prchal, J.T., Throckmorton, D.W., Carroll III, A.J., Fuson,
E.W., Gams, R.A. & Prchal, J.F. (1978). *Nature (London)*
274, 590 - 591
- Proudfoot, N.J. & Brownlee, G.G. (1976). *Nature (London)*
263, 211 - 214
- Ragg, H. & Weissmann, C. (1983). *Nature (London)* 303, 439 -
442
- Razin, A. & Riggs, A.D. (1980). *Science* 210,
604 - 610
- Reid, K.B.M. & Porter, R.P. (1981). *Ann. Rev. Biochem.* 50,
433 - 464

- Rencricca, N., Rizzoli, V., Howard, D., Duffy, P. & Stohlman jr. F. (1970). *Blood* 36, 764 - 771
- Richardson C.D., Berkovich, A., Rozenblatt, S. & Bellini, W.J. (1985). *J. Virol.* 54, 186 - 193
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977). *J. Mol. Biol.* 113, 237 - 251
- Rucinski, B., Niewiarowski, S., James, P., Walz, D.A. & Budzynski, A.Z. (1979). *Blood* 53, 47 - 62
- Rüther, U. (1982). *Nucl. Acids Res.* 10, 5765 - 5772
- Rüther, U. & Müller-Hill, B. (1983). *EMBO J.* 2, 1791 - 1794
- Ryals, J., Dierks, P., Ragg, H. & Weissmann, C. (1985). *Cell* 41, 497 - 507
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 74, 5463 - 5467
- Sanger F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J.H. & Roe, B.A. (1980). *J. Mol. Biol.* 143, 161 - 178
- Schechter, I. & Berger, A. (1967). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157 - 162
- Schrader, J.W., Lewis, S.J., Clark-Lewis, I. & Culvenor, J.G. (1981). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 78, 323 - 327
- Schrader, J.W., Battye, F. & Scollay, R. (1982). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 79, 4161 - 4165
- Senior, R.M., Griffin, G.L., Huang, J.S., Walz, D.A. & Deuel, T.F. (1983). *J. Cell. Biol.* 96, 382 - 385
- Smith, H. & Birnstiel, M. (1976). *Nucl Acids Res.* 3, 2387 - 2398
- Southern, E.M. (1975). *J. Mol. Biol.* 98, 503 - 517

- Staeheli, P., Haller, O., Boll, W., Lindenmann, J. & Weissmann, C. (1986). *Cell* 44, 147 - 158
- Stanley, E., Metcalf, D., Sobieszczuk, P., Gough, N.M. & Dunn, A.R. (1985). *EMBO J.* 4, 2569 - 2573
- Stewart II, W.E., DeClercq, E., Billiau, A., Desmyter, J. & DeSomer, P. (1972). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 69, 1851 - 1854
- Stewart II, W.E. (1979). *The Interferon System*, Springer, Berlin
- St. John, T.P. & Davis, R.W. (1979). *Cell* 16, 443 - 452
- Stohlman jr. F., Quesenberry, P., Niskanen E., Morley, A., Tyler, W., Rickard, K., Symann, M., Monette, F. & Howard, D. (1973). In: *Haemopoietic Stem cells*, ed. by Wolstenholm, G.E.W. & O'Connor, M., Associated Scientific Publishers, Amsterdam, p. 205
- Streuli, M., Hall, A., Boll, W., Stewart II, W.E., Nagata S. & Weissmann, C. (1981). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 78, 2848 - 2852
- Sundstrom, C. & Nilsson, K. (1976). *Int. J. Cancer* 17, 565 - 577
- Swift, G.H., Dagorn, J.-C., Ashley, P.L., Cummings, S.W. & MacDonald, R.J. (1982). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 79, 7263 - 7267
- Taniguchi, T., Sakai, M., Fujii-Kuriyama, Y., Muramatsu, M., Kobayashi, S. & Sudo, T. (1979). *Proc. Jap. Acad.* 55, Ser. B, 464 - 469
- Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takoaka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. & Hamuro, J. (1983). *Nature (London)* 302, 305 - 310

- Taub, F. & Thomson, E.B. (1982). *Anal. Biochem.* 126, 222 - 230
- Till, J.E. & McCulloch, E.A. (1961). *Radiat. Res.* 14, 213 - 219
- Till, J.E., McCulloch, E.A. & Siminovitch, L. (1964). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 51, 29 - 36
- Todokoro, K., Kioussis, D. & Weissmann, C. (1984). *EMBO J.* 3, 1809 - 1812
- Tosi, M., Young, A., Hagenbuechle, O. & Schibler, U. (1981). *Nucl. Acids Res.* 9, 2313 - 2323
- Tovey, M.G., Gresser, I., Vignaux, F. & Guymarho, J. (1986). *EMBO J.*, in press
- Valenzuela, D., Weber, H. & Weissmann, C. (1985). *Nature (London)* 313, 698 - 700
- van der Ploeg, L.H.T. & Flavell, R.A. (1980). *Cell* 19, 947 - 958
- Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A., Broome, S., Lomedico, P., Tizard, R., Naber, P.S., Chick, W.L. & Gilbert, W. (1978). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 75, 3727 - 3731
- Voller, A., Bartlett, A. & Bidwell, D.E. (1978). *J. Clin. Pathol.* 31, 507
- von Heijne, G. (1981). *Eur. J. Biochem.* 116, 419 - 422
- von Heijne, G. (1984). *J. Mol. Biol.* 173, 243 - 251
- von Heijne, G. (1985). *J. Mol. Biol.* 184, 99 - 105
- Walz, D.A., Wu, V.Y., de Lamo, R., Dene, H. & McCoy, L.E. (1977). *Thromb. Res.* 11, 893 - 898
- Watson, M.E.E. (1984). *Nucl. Acids Res.* 12, 5145 - 5164
- Weaver, R.F. & Weissmann, C. (1979). *Nucl. Acids. Res.* 7, 1175 - 1193

- Weber, K., Pringle, J.R. & Osborn, M. (1972). Methods in Enzymology 26, 3 - 27
- Weidle, U. & Weissmann, C. (1983). Nature (London) 303, 442 - 446
- Weintraub, H. & Groudine, M., (1976). Science 193, 848 - 856
- Weislander, L. (1979). Anal. Biochem. 98, 305 - 309
- Weissmann, C. & Weber, H. (1986). Prog. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol. (in press)
- Welte, K., Platzter, E., Lu, L., Gabrilove, J.L., Levi, E., Mertelsmann, R. & Moore, M.A.S. (1985). Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 82, 1526 - 1530
- Woodbury, R.G., Katunuma, N., Kobayashi, K., Titani, K. & Neurath, H. (1978). Biochemistry 17, 811 - 819
- Woodbury, R.G. & Neurath, H. (1980). FEBS 114, 189 - 196
- Wu, A.M., Till, J.E., Siminovitch, L. & McCulloch, E.A. (1967). J. Cell. Physiol. 69, 177 - 184
- Wu, A.M., Till, J.E., Siminovitch, L. & McCulloch, E.A. (1968). J. Exp. Med. 127, 455 - 463
- Yokata, T., Arai, N., Lee, F., Rennick, D., Mosmann, T. & Arai, K., (1985). Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 82, 68 - 72
- Youssef, A.H. & Barkhan, P. (1968). Br. Med. J. 1, 746 - 748

CURRICULUM VITAE

Von Jürg Schmid, geboren am 2. Januar 1956 in Zürich, Bürger von Kilchberg, Zürich und Illnau.

- 1962 - 1968 Primarschule in Kilchberg
- 1968 - 1970 Sekundarschule in Kilchberg
- 1970 - 1974 Kantonsschule Zürich, Oberrealschule,
Abschluss mit Matura (Typ C)
- 1974 - 1980 Studium an der Philosophischen Fakultät II der
Universität Zürich, Hauptfach Molekularbiologie,
Abschluss als dipl. Naturwissenschaftler
- 1980 - 1986 Doktorarbeit am Institut für Molekularbiologie I
der Universität Zürich unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. C. Weissmann

Während meiner Studienzeit bestand ich folgende Prüfungen:

- 1. Vordiplom, 1976
- 2. Vordiplom, 1977
- Schlussdiplom, 1980

Ich besuchte die Kurse und Vorlesungen folgender Dozenten:

- Biochemie: Christen, Humbel, Kägi
- Biologie: Bachofen, Biegert, Billeter, Birnstiel, Burla, Chen,
Clarkson, Cook, Hohl, Kubli, Kuhn-Schnyder, Nöthiger,
Rast, Rieber, Schaffner, Wanner, Weber, Wehner, Weiss-
mann, Ziswiler
- Chemie: Eugster, Fischer, Oswald, Viscontini, Wagnière
- Mathematik: Batschelet
- Physik: Brun

Während meiner Doktorarbeit war ich als Assistent am Institut für Molekularbiologie I der Universität angestellt.

